



FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA

MECANISMOS IMPLICADOS EN LA ACCIÓN ANTIOXIDANTE DE
POLIFENOLES NATURALES EN PRODUCTOS DE LA PESCA Y
ACUICULTURA

TESIS DOCTORAL

RODRIGO MAESTRE DEL CURA

Santiago de Compostela

2012

Antonio Moreda Piñeira, Director del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela

Informa:

Que **Don Rodrigo Maestre del Cura** ha realizado el trabajo recogido en la memoria titulada “**Mecanismos implicados en la acción antioxidante de polifenoles naturales en productos de la pesca y acuicultura**” bajo la tutela de M^a del Carmen Mejuto Martí, perteneciente a este departamento, y bajo de la dirección de los Drs. María Isabel Medina Méndez y Manuel Pazos Palmeiro en el Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (CSIC), que presenta para optar al grado de Doctor en Química.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Santiago de Compostela, a 11 de Enero de 2012.

D. Alberto Moreda Piñeira

Dña María Isabel Medina Méndez, Profesora de Investigación en el Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (CSIC) y el Dr. Manuel Pazos Palmeiro, Doctor Contratado en el Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (CSIC)

Informan:

Que la presente memoria, titulada “**Mecanismos implicados en la acción antioxidante de polifenoles naturales en productos de la pesca y acuicultura**”, que presenta el Licenciado en Ciencias Químicas D. Rodrigo Maestre del Cura para optar al grado de Doctor en Química, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Investigaciones Marinas del CSIC de Vigo y reúne los requisitos necesarios para ser defendida ante el tribunal calificador, por lo que autorizamos su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firmamos el presente informe en Vigo, a 11 de enero 2012.

Fdo. Dra. María Isabel Medina Méndez

Fd. Dr. Manuel Pazos Palmeiro

Dña María del Carmen Mejuto Martí, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela

Informa:

Que la presente memoria, titulada “**Mecanismos implicados en la acción antioxidante de polifenoles naturales en productos de la pesca y acuicultura**”, que presenta el Licenciado en Ciencias Químicas D. Rodrigo Maestre del Cura para optar al grado de Doctor en Química, ha sido realizada bajo su tutela y reúne los requisitos necesarios para ser defendida ante el tribunal calificador, por lo que autorizo su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Vigo, a 11 de enero 2012.

Fdo. M^a Carmen Mejuto Martí

El trabajo de investigación que se presenta en esta memoria se ha desarrollado en grupo de Química de Productos Marinos del Instituto de Investigaciones Marinas (IIM) de Vigo, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y ha sido financiado por el siguiente proyecto:

“Mecanismos de acción de ingredientes polifenólicos de origen natural como antioxidantes alimentarios y como componentes funcionales de la pesca y la acuicultura”, concedido por el Ministerio de Educación y Ciencia (AGL-2006-12210-C03-01)

Para la realización de la presente tesis, D. Rodrigo Maestre del Cura ha sido beneficiario de una beca-contrato del programa de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia.

Los resultados obtenidos de este trabajo han dado lugar hasta la fecha de su presentación a una patente y a cuatro publicaciones científicas aceptadas y dos enviadas:

- Involvement of Methemoglobin (MetHb) Formation and Hemin Loss in the Pro-oxidant Activity of Fish Hemoglobins. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 7013-7021
- Capacity of Reductants and Chelators to prevent Lipid Oxidation Catalyzed by Fish Hemoglobins. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 9190-9196
- Incorporation and interaction of Grape Seed Extract in Membranes and Relation with Efficacy in Muscle Foods. *J. Agric. Food. Chem.* 2010, 58, 8365-8374
- Role of the raw Composition of Pelagic Fish Muscle on the Development of Lipid Oxidation and Rancidity during Storage. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 6284-6291
- Procedimiento para determinar la susceptibilidad a desarrollar oxidación lipídica en productos alimenticios que contienen ácidos grasos insaturados. Patente de invención nº P201131443. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Proteomic approach to evaluate myofibril carbonylation in chilled fish mince and its antioxidants protection by polyphenols. *Food Chemistry*. Enviado
- Altered Digestion and Intestinal Assimilation of Oxidized Compared to Unoxidized Dietary Polyunsaturated Fatty Acids and the Protective Effects of a Polyphenol-rich Grape Seed Extract. *Journal of Nutrition*. Enviado

AGRADECIMIENTOS

En estas páginas quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que de alguna manera significativa han pasado por mi vida durante estos 4 años y medio.

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesis, Isabel Medina Méndez, la posibilidad que me brindó para poder realizar esta tesis doctoral. Sin su fe inicial en mí y su paciencia a lo largo de este periodo nada hubiera sido posible. Manuel, lo que has hecho tú por mí durante estos años no tiene precio, todos tus consejos, nuestras charlas, tus comentarios y ánimos durante mis horas bajas servían como revulsivo en mi autoestima. Has sido siempre mi primer recurso y sin ti esta tesis no hubiera sido posible. Dios quiera que puedas estabilizar tu situación pronto para puedas seguir con tu labor investigadora despreocupándote del futuro. También quiero agradecer a Jose Manuel Gallardo y Santiago Aubourg el haber estado ahí siempre que los he necesitado. Además quiero agradecer a Vicente Micol y Judith Storch el haberme acogido, en Elche y New Brunswick respectivamente, durante mis estancias.

Desde que Salomé me recogió en la recepción del Instituto, cual perrillo abandonado, ha habido un gran número de personas que han marcado mi estancia en Vigo en mayor o menor grado. Gracias a Chus, Durán, Trigo (bis), Gabriel, Cris, Vicky, Lore, Su, Helena, Marta, Maribel, Cruz, Salomé por aguantarme y no perder la paciencia conmigo aunque ya sabíais que.....mi poyata mis normas!!!! Gracias a mis antecesores Mónica, Jacobo e Ignacio por ser mis referentes y mostrarme como se deben de hacer las cosas. Especialmente a los chicos por ser mis primeros amigos en la ciudad olívica. Espero que mis sucesoras, la locaza y mi peque, no sigan mis pasos porque si no apañadas van. Mil besotes a María y Ana por haber sido mi familia dentro del laboratorio (madre y hermana mayor respectivamente). Gracias a bolu (Licenciado Fernando Muñoz) y Palomares por todos los cafés que tomamos en los aposentos del Dr. Villalaín, y en especial a ti Francis por venir a verme a Estados Unidos, recuerda que tenemos Argentina pendiente. Esa Requete que apareció en medio de mis dos estancias, la cual me he enterado que tiene todas sus vacunas al día 11 meses después de estar dándole besos todas las mañanas. A ti Fran, que sabes que te tengo un enorme aprecio, y a Carmen Sotelo que aunque se que se hace la dura, me tiene mucho aprecio y no pudo resistirse a uno mis achuchones. Gracias a todos mis compañeros de laboratorio que

tuve en Rutgers University por nunca quejarse cuando tenía la música a todo volumen por la tarde. Se que a pesar de mi nivel de inglés me tienen mucho aprecio. Mención especial tiene haberte conocido a ti Palomita, sabes que fuiste mi cimiento en USA y sin ti no hubiera sido lo mismo. Nunca me olvidaré de ti.

En un punto independiente quiero englobar a todas las nuevas incorporaciones o personas con las que no tenía mucha confianza y que me encontré a la vuelta de mi periplo americano, gracias a ellas he podido disfrutar de mi mejor año en Vigo. En primer lugar quisiera agradecer a los astros que me hicieran coincidir en el espacio-tiempo con mis tres pelirrojas. Cada una es única y no comparable, haciéndome sentir, tanto juntas como por separado, la persona más especial del universo. A Paula quiero agradecerla que siempre esté con una sonrisa en la cara, ya te lo he dicho muchas veces pero verte cada mañana nos levanta el ánimo a todos. Mónica, una de las personas más increíbles que he conocido a pesar de su esferita personal, la cual ignoro. El mundo necesita más gente como tú. A Luci, grrrrrrrr, por todas nuestras tardes chinchándote y donde Ana tenía que poner paz. Y por último gracias a Chema, Carlos y Eduardo, ellos saben que son chicos y mis halagos se dirigen más hacia el otro género.

Fuera del Instituto me gustaría hacer mención especial a Gallego, alias sabrosón. Aunque le conozco de hace poco ha rellenado un hueco muy importante aquí, el de un muy buen amigo. También gracias a toda la gente que he conocido de O Barco de Valdeorras con las que, a pesar de estar como un cencerro, me lo he pasado genial. A tí Gema, por tu energía inagotable, tus afters y tu cuerpo escombros. Y finalmente en este apartado gracias a Sergio, una persona de corazón noble que no alberga maldad alguna.

Más allá de Vigo, y aunque estos 4 años me he distanciado un poco de ellos, se que siempre están y estarán mis AMIG@S de Aranda. Gracias a los valientes que habéis venido a verme y gracias por acogerme cuando os he ido a ver. Ánimo Henar, no desistas aunque sigamos siendo unos incomprensidos.

Por último y más importante a mis padres-hermano, espero que esta tesis aclare y solucione la desinformación a la que os he tenido durante estos 4 años (es que soy muy raro).

Muchas gracias a todos por haberme aguantado

A mis padres,

sin ellos no habría llegado hasta aquí

ÍNDICE

Símbolos y abreviaturas.....	1
I. Introducción.....	3
1. El Pescado y los Productos Derivados de la Pesca.....	5
2. La Oxidación en el Pescado y Productos Derivados de la Pesca.....	10
2.1 Cambios post-mortem en los lípidos de pescado.....	10
2.2 La oxidación lipídica.....	11
2.3 Factores que afectan a la oxidación.....	14
2.3.1 Lípidos Insaturados.....	14
2.3.2 Prooxidantes endógenos.....	15
2.3.3 Antioxidantes endógenos.....	20
3. Cambios post-mortem que afectan a la Susceptibilidad Oxidativa.....	25
4. Métodos Utilizados para Evitar la Oxidación Lipídica en Pescado.....	27
5. Uso de Antioxidantes como Estrategia para Inhibir la Oxidación Lipídica....	30
5.1 Antioxidantes sintéticos.....	31
5.2 Antioxidantes naturales.....	32
6. Residuos Agroalimentarios como Fuente de Compuestos Antioxidantes Utilizados en Alimentación.....	38
6.1 Residuos vinícolas como fuente de aditivos antioxidantes de origen alimentario.....	39
7. Factores que Afectan a la Actividad Antioxidante de un Compuesto.....	40
7.1 Relación estructura-actividad.....	40
7.2 Localización-actividad.....	41
8. Alimentación y estrés oxidativo.....	43
II. Justificación y Objetivos.....	45
III. Fundamentos de la Metodología Empleada.....	49
1. Sistemas Modelo Utilizados para Evaluar la Extensión de la Oxidación Lipídica.....	51
2. Compuestos Fenólicos Procedentes del Extracto de Semilla de Uva.....	52
3. Metodología para Determinar la Capacidad Antioxidante <i>in Vitro</i>	53
3.1 Capacidad reductora.....	54

3.2	Capacidad antirradicalaria.....	54
3.3	Capacidad quelatante.....	54
4.	Métodos para Determinar la Extensión de la Oxidación Lipídica.....	55
4.1	Valor de peróxidos.....	56
4.2	Hidroperóxidos conjugados.....	56
4.3	Índice de ácido Tiobarbitúrico.....	56
5.	Sistemas Modelo de Membrana.....	57
6.	Técnicas Utilizadas para Estudiar la Incorporación e Interacción de Compuestos en Membranas Modelo.....	58
6.1	Fluorescencia.....	58
6.1.1	Quenching de fluorescencia.....	59
6.1.2	Anisotropía de fluorescencia.....	60
6.1.3	Polarización generalizada de lauridan	61
6.2	Efecto Tyndall.....	61
6.3	Calorimetría Diferencial de Barrido.....	62
7.	Técnicas Utilizadas para Estudiar la Absorción de Nutrientes.....	63
7.1	Modelo de tracto gastrointestinal TIM-1.....	63
7.2	Modelo intestinal: Línea Celular Caco-2.....	64
IV.	Resultados y Discusión.....	67
	Capítulo 1: Determinación de los Mecanismos implicados en la Actividad Prooxidante de la Hemoglobina en Sistemas Lipídicos, así como su inhibición mediante antioxidantes con capacidad quelatante y donadora de electrones.....	69
1.1	Introducción.....	71
1.2	Publicación: <i>Involvement of Methemoglobin (MetHb) Formation and Hemin Loss in the Prooxidant Activity of Fish Hemoglobins</i>	75
1.3	Publicación: <i>Capacity of Reductants and Chelators to Prevent Lipid Oxidation Catalyzed by Fish Hemoglobins</i>	87
	Capítulo 2: Incorporación e Interacción de Polifenoles Naturales en Membranas y su relación con la eficacia antioxidante en alimentos compuestos por músculo de pescado.....	97
2.1	Introducción	99

2.2 Publicación: <i>Incorporation and Interacion of Grape Seed Extract in Membranes and Relation with Efficacy in Muscle Foods</i>	101
Capítulo 3: Influencia de la composición inicial en el desarrollo de la oxidación lipídica en músculo de caballa	113
3.1 Introducción.....	115
3.2 Publicación: <i>Role of Raw Composition of Pelagic fish Muscle on the Development of Lipid oxidation and Rancidity Turing Storage</i>	117
Capítulo 4: Procedimiento para determinar la susceptibilidad a desarrollar oxidación lipídica en productos alimenticios que contienen pescado y derivados de la pesca.....	127
4.1 Introducción.....	129
4.2 Patente: <i>Procedimiento para determinar la susceptibilidad a desarrollar oxidación lipídica en productos alimenticios que contienen ácidos grasos insaturados</i>	131
Capítulo 5: Digestión y Absorción Intestinal de PUFAs Oxidados y no Oxidados de Cadena larga Presentes en el Pescado, así como el Efecto de Polifenoles de Origen natural en dichos Procesos.....	173
5.1 Introducción.....	175
5.2 Material y Métodos.....	178
5.2.1 Reactivos.....	178
5.2.2 Material y equipo de Cultivo Celular.....	178
5.2.3 Cultivo de la Línea Celular Caco-2.....	179
5.2.4 Mantenimiento de la Línea Celular Caco-2.....	179
5.2.5 Método de tripsinización y siembra de las células.....	180
5.2.6 Preparación del medio de cultivo con ácidos grasos marcados con ¹⁴ C.....	181
5.2.7 Ensayos de absorción de ácidos grasos.....	181
5.2.8 Determinación del contenido en proteínas.....	181
5.2.9 Extracción lipídica.....	182
5.2.10 Metabolismo de los ácidos grasos en las células Caco-2.....	182
5.2.11 Cuantificación lipídica.....	182
5.2.12 Medida de los dienos conjugados.....	182

5.2.13 Oxidación del DHA.....	183
5.2.14 Preparación del sistema de músculo picado de Mujol Gris (<i>Mugil cephalus</i>).....	183
5.2.15 Modelo de tracto gastrointestinal TIM-1.....	183
5.2.16 Extracto de semilla de uva rico en procianidinas.....	184
5.2.17 Análisis estadístico.....	184
5.3 Resultados.....	185
5.3.1 Digestión de los PUFAs y bioaccesibilidad de los subproductos de la oxidación lipídica en los dializados intestinales.....	185
5.3.2 Asimilación y metabolismo de los ácidos grasos por las células Caco-2.....	185
5.4 Discusión.....	192
5.5 Conclusiones.....	195
V. Discusión Integradora.....	197
VI. Conclusiones.....	207
VII. Bibliografía.....	213

Símbolos y Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico
AEDT: ácido etilendiamintetraacético
AGL: Ácidos grasos libres
ATP: adenosin trifosfato
BHA: Butil-hidroxianisol
BHT: Butil-hidroxitolueno
DC: dienos conjugados
desoxiHb: desoxihemoglobina
DHA: Ácido docosaheptaenoico
DPH: 1,6-difenil-1,3,5 hexatrieno
DPH: Ácido Docosapentaenoico
DSC: Calorimetría diferencial de barrido
EPA: Ácido eicosapentaenoico
Hb: hemoglobina
HDL: Lipoproteínas de alta densidad
Kp: Coeficiente de partición
LDL: Lipoproteínas de baja densidad
LUVs: vesículas unilamelares grandes
MDA: malondialdehído
metHb: metahemoglobina
MLVs: vesículas multilamelares
NADH: nicotiamida-adenina dinucleótido
NADPH: nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato
nm: nanómetros
PA-DPH: ácido 3-(4-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil) propiónico
Pre-RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
PUFA: Ácido graso poliinsaturado
ROS: sustancias reactivas de oxígeno
SSO: Organismos específicos del deterioro
STTP: tripolifosfato de sodio
SUVs: vesículas unilamelares pequeñas
TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TBHC: Terbutilhidroquinona

TMA-DPH: 1-(4-trimetilamonio-fenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno

I. INTRODUCCIÓN

1. EL PESCADO Y LOS PRODUCTOS DERIVADOS DE LA PESCA

La importancia que tienen unos buenos hábitos alimentarios sobre la salud y la calidad de vida de las personas se estableció de manera inequívoca hace varias décadas. Una correcta alimentación debe aportar los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades nutricionales de cada persona. Hoy en día, la ciencia de la nutrición ha evolucionado a partir de los conceptos clásicos, como podía ser tratar de evitar las deficiencias de nutrientes, a una nutrición “positiva” u “óptima”, centrada en la identificación de componentes biológicamente activos de los alimentos que ofrezcan la posibilidad de mejorar las condiciones físicas y mentales, así como de reducir el riesgo de desarrollar enfermedades. El concepto de alimento funcional surgió en Japón hacia la década de los 80 con la finalidad de disminuir los costes en el tratamiento de enfermedades crónicas de la población longeva, y por tanto reducir el gasto sanitario (1). Podríamos denominar a un alimento como funcional cuando, más allá de su valor nutricional, ha demostrado satisfactoriamente que tiene un efecto beneficioso sobre una o más funciones del organismo humano, de tal forma que es relevante para mejorar la salud humana, la calidad de vida o para disminuir los riesgos de padecer ciertas enfermedades.

El pescado es considerado como un alimento muy completo, ya que desde el punto de vista nutricional posee las proporciones adecuadas de proteínas, vitaminas y minerales (2), pero en particular, posee una gran proporción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de cadena larga. La mayor parte de esos ácidos grasos poliinsaturados pertenecen a la familia de los ω -3, como los ácidos eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω -3), docosahexaenoico (DHA, 22:6 ω -3) y docosapentaenoico (DPA 22:5 ω -3). La elevada cantidad de PUFAs convierte al pescado, además de en un excelente alimento desde el punto de vista nutricional, en un alimento funcional portador de compuestos bioactivos, en este caso los PUFAs ω -3. El papel beneficioso del pescado se estudió en el siglo pasado sobre esquimales de Groenlandia, que mostraban un perfil lipídico en plasma con niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) inferiores y de lipoproteínas de alta densidad (HDL) superiores comparado con el de ciudadanos daneses. Se demostró que tales diferencias no dependían de factores genéticos sino de la dieta de los esquimales, rica en aceite y carne de pescado. El mayor beneficio que se ha atribuido al consumo de este tipo de ácidos grasos es la disminución de los niveles de triglicéridos y colesterol asociados a las LDL, que se encuentran entre los mayores factores de riesgo de

dolencias cardiovasculares (3). Estudios realizados han establecido que un aumento en la dieta de los PUFAs ω -3 puede reducir el riesgo de sufrir arritmias (4), modula la composición de ácidos grasos en muchos tejidos (5) y reduce la deposición de grasa en el cuerpo (6). También se ha estudiado el impacto de los PUFAs en la coagulación de la sangre, observándose una menor coagulación. Esto es debido a que la formación de tromboxanos a partir de ácidos grasos ω -3 provoca un aumento de la fluidez de la sangre y una disminución en la agregación de las plaquetas (7). Como consecuencia de sus propiedades anticoagulantes, los PUFAs ω -3 también disminuyen el riesgo de sufrir un infarto cerebral. Otros beneficios para la salud de los ácidos ω -3 incluyen la reducción de la respuesta inflamatoria (8), la menor susceptibilidad a sufrir una enfermedad mental (9) y la mejora de las funciones del cerebro y los ojos en los niños (10).

Debido a los beneficios en la salud de las poblaciones con dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados, se ha despertado un gran interés por parte de los organismos internacionales relacionados con la Sanidad y Salud Pública por la adopción de un patrón dietético más saludable que constituiría una herramienta de prevención efectiva y aplicable a toda la población desde edades muy tempranas. Por este motivo, la ingesta de PUFAs ha sido incluida en las recomendaciones nutricionales para la prevención de enfermedades cardiovasculares, tal y como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Recomendaciones en el consumo de PUFAs realizadas por distintos organismos internacionales

Organismo	Año	Población	Recomendación
World Health Organization (WHO,2003)	2003	Población adulta en general	6-10% de la energía diaria de AGPI: 5-8% AGPI ω -6 1-2% AGPI ω -3
American Heart Association “AHA” (Kirs-Etherton et al.,2002)	2002	Adultos sin ECV	Comer pescado dos veces/semana
		Adultos con ECV	1g/día de EPA+DHA (preferiblemente de aceite de pescado)
		Adultos con triglicéridos elevados	2-4 g/día de EPA+DHA
Workshop “The essentiality of recommended dietary intakes from ω -6 y ω -3 fatty acids” (Simpoulous et al., 2000)	2000	Población adulta en general	LA: 4.44g/día/2000kcal ALA:2.22g/día/2000kcal DHA+EPA: 0.65g/día/2000kcal
British Nutrition Foundation (BNF,1999)	1999	Población adulta (19-50 años)	LA:1%de la energía diaria EPA+DHA: 1.25g/día

Debido a las propiedades beneficiosas para la salud de los ω -3 PUFAs, y a que su consumo entre la población se encuentra por debajo de los niveles recomendados, los alimentos enriquecidos con aceite de pescado son un grupo de productos que han experimentado un rápido crecimiento tanto en Europa como en USA durante los últimos años. Yogures, aliños para ensaladas, mayonesas, pan o espaguetis son algunos ejemplos de alimentos enriquecidos con PUFAs procedentes de aceites de pescado.

Esencialmente, los ácidos grasos que se encuentran formando parte de los lípidos suelen constituir entre 0,2% y un 25% del peso en los productos pesqueros (11). En función de la abundancia de éstos, los pescados se pueden clasificar desde el punto de vista nutritivo en:

- Pescados magros: su contenido graso es como máximo del 2% y se almacena principalmente en el hígado. Este tipo de pescados lleva una vida sedentaria, con desplazamientos cortos y por ello no necesitan almacenar grasa como fuente de energía. En este grupo se encuentran especies como el abadejo, bacalao, bacaladilla, faneca, gallo, lenguado o merluza.
- Pescados semigrasos: su contenido en grasa varía entre el 2% y el 5%. En este grupo se incluye a la lubina, besugos, dorada, rodaballo o trucha.
- Pescados grasos o azules: su contenido graso es superior al 6% y suele oscilar entre el 8 y el 15%. Este tipo de pescado está formado por especies pelágicas que destacan por su carácter migratorio. Dentro de este grupo se incluyen la caballa, la sardina y el atún. La grasa suele localizarse como gotas extracelulares en tejido muscular, sobre todo en la capa situada debajo de la piel.

Los ácidos grasos de los mamíferos raramente contienen más de dos dobles enlaces por molécula, mientras que los depósitos grasos del pez contienen muchos ácidos grasos con más 5 dobles enlaces (12). La composición y la cantidad de ácidos grasos que componen el tejido del pescado puede verse afectada por la dieta, tamaño, edad, ciclo reproductivo, salinidad, temperatura, estación y localización geográfica (13-18). Los peces herbívoros contienen gran cantidad de PUFAs de cadena corta (14, 19). Los peces que se alimentan de otros peces, son más ricos en PUFAs ω -3 de cadena larga pero poseen un contenido inferior en ácido linolénico. Los peces omnívoros, tienen una mayor proporción de ácido linolénico pero una proporción menor de PUFAs ω -3 de cadena larga (19). La temperatura del agua también resulta ser un factor influyente en la

composición lipídica. Especies de agua fría poseen niveles más elevados de ácidos grasos ω -6 y ω -9 (20). Generalmente, un descenso en la temperatura donde habita el pez tiene como consecuencia un incremento en el grado de insaturación (14) debido a que se necesita un nivel más alto de ácidos grasos poliinsaturados para mantener la flexibilidad y permeabilidad en los fosfolípidos de membrana (20). El cambio más importante en la cantidad total de lípidos y composición en ácidos grasos de pescado es observado durante el periodo de reproducción. En este periodo, el almacenamiento de lípidos, así como de proteínas, vitaminas y minerales en músculo, hígado y órganos viscerales, es movilizado hacia las gónadas con el fin de asegurar la maduración (21, 22). También se ha encontrado que el porcentaje total de PUFA es levemente menor en los lípidos de peces de agua dulce que en los lípidos de peces agua salada (12).

El valor funcional de la gran cantidad de PUFA presentes en el pescado y productos derivados de la pesca juega en contra de su estabilidad y su conservación. Los ácidos grasos poliinsaturados son compuestos que sufren con relativa facilidad reacciones de oxidación cuyo resultado es la aparición de sabores y olores desagradables, junto con la pérdida de compuestos bioactivos como son los ácidos grasos ω -3 (23, 24). Además, los productos de la oxidación de los lípidos pueden resultar tóxicos para la salud debido a sus efectos citotóxicos y genotóxicos (25, 26). La oxidación origina radicales libres y peróxidos, los cuales se relacionan con el desarrollo de algunos tipos de cáncer, arteriosclerosis, artritis, enfermedades neurodegenerativas y con el proceso de envejecimiento (27). Los productos enriquecidos con PUFA ω -3 procedentes de aceite de pescado presentan el mismo problema de estabilidad que el músculo de pescado, el desarrollo de la rancidez oxidativa. La disminución de la vida útil del producto debido a la aparición de aromas y sabores asociados a la rancidez son algunos de los problemas asociados a este tipo de productos enriquecidos (28). Por otro lado, la adición de aceite de pescado en alimentos puede provocar alteraciones organolépticas atribuidas al olor a pescado.

En la actualidad existen distintos tipos de metodologías utilizadas para aumentar la fecha de consumo preferente y de caducidad de pescado y productos derivados de la pesca relacionadas con la protección de los lípidos. Dichos procedimientos pueden clasificarse como físicos, basados en la variación de la temperatura, el lavado, desangrado o el precocinado, y químicos, basados en la adición de antioxidantes, que inhiben de manera eficaz la oxidación lipídica. Los antioxidantes sintéticos han sido empleados habitualmente para inhibir la oxidación lipídica y retrasar el desarrollo de la

rancidez en alimentos. A pesar de que estos compuestos artificiales resultan eficientes y relativamente baratos, su uso tiende a restringirse debido a la pobre aceptación que presentan en el consumidor y a que numerosos estudios ponen en juicio su seguridad toxicológica (29). En los últimos años, han aumentado de manera exponencial las investigaciones destinadas al estudio de los compuestos de origen natural, con la finalidad de proponer antioxidantes naturales alternativos a los antioxidantes sintéticos. Además, los aditivos antioxidantes podrían incrementar el carácter funcional de los alimentos sobre los que se aplican puesto que se ha postulado que pueden ejercer una acción beneficiosa frente a patologías derivadas del estrés oxidativo (30).

2. LA OXIDACIÓN EN EL PESCADO Y PRODUCTOS DERIVADOS DE LA PESCA.

Los lípidos son un grupo muy heterogéneo de moléculas que usualmente se clasifican en dos grupos, dependiendo de que posean en su composición ácidos grasos (lípidos saponificables) o no los posean (lípidos insaponificables). Dentro de los lípidos saponificables se encuentran dos subgrupos, el de los lípidos simples, que son moléculas que solo contienen carbono, hidrógeno, oxígeno, y el de los lípidos complejos, que además de contener en sus moléculas carbono, hidrógeno y oxígeno, también contienen otros elementos como nitrógeno, fósforo, azufre u otra molécula como un glúcido. A los lípidos complejos se les denominan lípidos de membrana pues son los principales compuestos que forman las membranas celulares.

2.1 Cambios post-mortem en los lípidos de pescado

En la etapa post-mortem del pescado ocurren dos reacciones diferentes de gran importancia en el deterioro de la calidad de los lípidos, la hidrólisis y la oxidación. La hidrólisis de un lípido consiste en la ruptura de un enlace éster entre un ácido graso y un alcohol mientras que la oxidación lipídica es la incorporación de una molécula de oxígeno molecular a la estructura de un lípido. Como resultado de la oxidación lipídica se produce la formación de una serie de sustancias, algunas de las cuales tienen sabores y olores desagradables (rancidez). Algunas de estas reacciones también pueden contribuir a cambios de textura mediante uniones covalentes a las proteínas musculares. Las reacciones pueden ser de naturaleza no enzimática o naturaleza enzimática, catalizadas por enzimas microbianas, intracelulares o digestivas del mismo pescado. El significado relativo de estas reacciones depende principalmente de la especie de pescado y de la temperatura de almacenamiento. Los pescados grasos son particularmente susceptibles a la degradación lipídica, la cual puede ocasionar severos problemas en la calidad, incluso durante el almacenamiento a temperaturas bajo cero.

Durante el almacenamiento del pescado, aparece una cantidad considerable de ácidos grasos libres (AGL) y otros productos de hidrólisis como diglicéridos y monoglicéridos. La reacción tiene mayor repercusión en el pescado no eviscerado que en el eviscerado, probablemente por la presencia de enzimas digestivas. Los triglicéridos presentes en los depósitos de grasas son hidrolizados por la trigliceril-lipasa, originada en el tracto digestivo o excretada por ciertos microorganismos. La producción de lipasas de origen

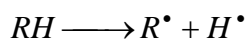
microbiano puede limitarse o inhibirse por la presencia en el medio de carbohidratos, lípidos y proteínas del tejido muscular (31, 32). Por ello, resulta poco probable que ocurra la actividad lipolítica microbiana hasta que no se haya agotado la glucosa en la superficie muscular.

2.2 La oxidación lipídica.

Como se ha mencionado previamente, la oxidación lipídica es una reacción que tiene una particular relevancia en los productos pesqueros debido a su elevada concentración de ácidos grasos poliinsaturados. Las reacciones de oxidación producen cambios en el aroma, sabor y textura del músculo, además de una disminución de sus propiedades nutricionales. Todos estos cambios que puede sufrir el músculo de pescado durante su procesado y almacenamiento disminuyen considerablemente su tiempo de conservación o vida útil debido a la aparición de características organolépticas asociadas a la rancidez (29).

La oxidación de los lípidos poliinsaturados de los alimentos implica una reacción en cadena de radicales libres, en su mayoría iniciada por la exposición de los lípidos a la luz, el calor, la radiación ionizante, las enzimas, los iones metálicos o las hemoproteínas, en la que interviene el oxígeno molecular (23). La menor energía de enlace de los hidrógenos alílicos y bis-alílicos, frente a los hidrógenos de los grupos metileno (75 y 88, frente a 100Kcal/mol, respectivamente), junto con la estabilización por resonancia del radical formado, contribuyen a la mayor inestabilidad oxidativa de los PUFAs (33). En la figura 1 se muestran los mecanismos del proceso de oxidación de un ácido graso con 2 dobles enlaces conjugados. Este mecanismo ocurre en tres etapas: iniciación, propagación y terminación:

Iniciación: La reacción de iniciación consiste en la formación de un radical libre o radical lipídico mediante la extracción de un átomo de hidrógeno del ácido graso (RH) o la rotura homolítica del enlace carbono-hidrógeno.



La oxidación directa de los lípidos insaturados por el oxígeno en estado triplete (3O_2) está prohibida por el principio de conservación de spin, ya que la multiplicidad de los lípidos en su estado de menor energía es singlete. La conversión de oxígeno triplete a

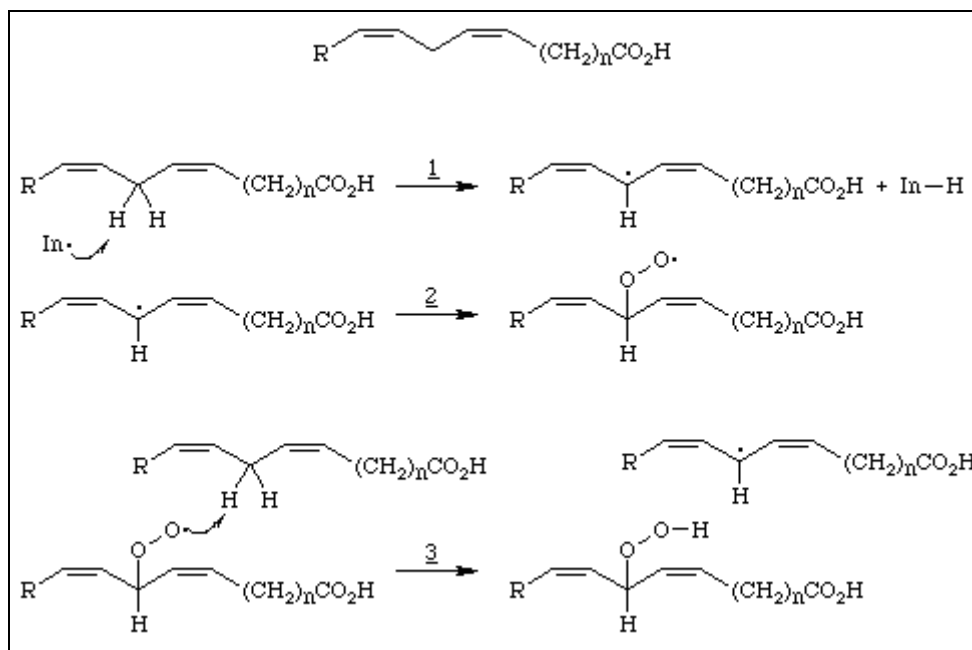
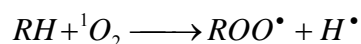


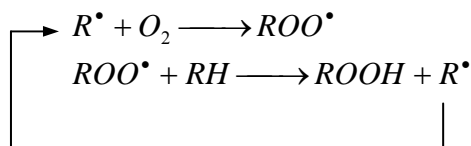
Figura 1: Esquema de la reacción de la oxidación primaria de un ácido graso con 2 dobles enlaces conjugados

oxígeno singlete (1O_2) necesita la presencia de fotosensibilizadores. Estos compuestos poseen un número elevado de dobles enlaces con capacidad de absorber luz y pasar a un estado de excitación, transfiriendo el exceso de energía al oxígeno triplete y convirtiéndolo en oxígeno singlete (34).

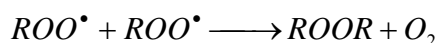
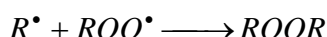
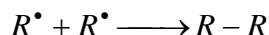


Otra manera de iniciar la oxidación lipídica es a través de enzimas que faciliten que el oxígeno triplete reaccione con el ácido graso para formar un hidroperóxido. Los principales grupos de enzimas implicados en este proceso son las peroxidasas y las dioxigenasas. Las lipoxigenasas y las ciclooxigenasas son dioxigenasas que producen hidroperóxidos por este mecanismo (35).

Propagación: En esta segunda etapa, el radical libre formado puede reaccionar con el oxígeno molecular y formar un radical peróxilo (ROO^\bullet). Este radical puede sustraer un átomo de hidrógeno de otro ácido graso insaturado para formar un hidroperóxido ($ROOH$) y un radical lipídico. Esta etapa también puede iniciarse en el radical peróxilo formado por fotooxidación o iniciación enzimática. Los radicales alcóxido procedentes de la descomposición de hidroperóxidos también pueden iniciar la oxidación lipídica.



Terminación: Durante esta etapa dos radicales libres interaccionan entre sí formando un producto no radicalario.



Los hidroperóxidos son compuestos sin sabor y olor, y frecuentemente se hace referencia a ellos como los productos primarios de la oxidación. Estos compuestos se caracterizan por su inestabilidad. Su descomposición origina los productos secundarios de la oxidación: aldehídos, cetonas y alcoholes, que son sustancias volátiles con atributos sensoriales a muy bajas concentraciones, a menudo inferiores a 1 ppm (29). Los productos secundarios de la oxidación son los responsables de los aromas y sabores asociados a la rancidez. Los aldehídos, generados durante la descomposición de los hidroperóxidos pueden reaccionar con compuestos con grupos amino libres para dar lugar a compuestos de interacción, también denominados compuestos terciarios. Dentro de estos compuestos se encuentran las bases de Schiff. Dichos compuestos y sus polímeros son los responsables de la aparición de pigmentos de color parduzco. Se ha de tener en cuenta que la formación de compuestos terciarios también es posible debido a la reacción de azúcares con grupos amino libres (36).

Debido a la complejidad del proceso oxidativo, frecuentemente se ha hecho uso de sistemas más sencillos, sistemas modelo, con la finalidad de esclarecer los procesos que rigen la oxidación de los lípidos en músculo. Los sistemas modelo más empleados para el estudio de los factores que afectan al desarrollo de la rancidez en el músculo de pescado son: sistemas liposomiales (37), suspensiones de membranas de músculo de pescado (38, 39), músculo de pescado picado y lavado (40, 41) y músculo de pescado picado (42).

2.3 Factores que afectan a la oxidación

Existen varios factores que promueven o retardan la oxidación del músculo de pescado. Éstos pueden ser factores intrínsecos, propios del tejido, o factores extrínsecos, procedentes del ambiente y condiciones que rodean al alimento. Dentro de los factores intrínsecos, se pueden distinguir tres grandes grupos de compuestos presentes en el músculo que pueden intervenir en la oxidación de los lípidos.

- ❑ Lípidos insaturados, que constituyen el sustrato oxidable.
- ❑ Sustancias que inician la oxidación, denominadas prooxidantes endógenos.
- ❑ Compuestos que retardan la oxidación, denominados antioxidantes endógenos.

2.3.1 Lípidos insaturados

La velocidad de oxidación de los ácidos grasos aumenta con el número de insaturaciones, ya que se generan nuevas posiciones entre dos dobles enlaces adyacentes que están favorecidas termodinámicamente para el ataque de los radicales libres (33).

Los lípidos se pueden encontrar en el músculo de pescado como lípidos estructurales o como depósitos de grasa. Los fosfolípidos y el colesterol se encuentran formando parte de los lípidos estructurales en las células y en los orgánulos de membrana. Hay estudios que indican que los fosfolípidos son los sustratos en los que se inicia la oxidación lipídica debido a su alto contenido en PUFAs y al contacto directo con sustancias prooxidantes (43, 44).

Los depósitos de grasa pueden encontrarse como triglicéridos o ácidos grasos libres. En el músculo de pescado se ha encontrado que la hidrólisis de los triglicéridos aumenta la oxidación. De hecho, en sistemas *in vitro*, se ha encontrado mayor susceptibilidad de los ácidos grasos libres a la oxidación que los esterificados (45). En el pescado, los lípidos se almacenan en el tejido subcutáneo, hígado, músculo y cabeza. Dentro del músculo de pescado se pueden encontrar dos partes con distinto contenido graso. El músculo rojo contiene más cantidad de grasa que el músculo blanco, debido a que el músculo rojo se utiliza para el desplazamiento prolongado de especies migratorias y utiliza la grasa como fuente energética, mientras que el músculo blanco se utiliza para movimientos rápidos o explosivos y no utiliza grasa como fuente energética. También dependiendo de la estación del año, el contenido en grasa de una misma especie puede variar debido a diversos factores como la dieta, temperatura del agua, estación, ciclo reproductivo o localización geográfica (13, 14, 16). Por otro lado, los individuos de una especie procedente de acuicultura contienen mayor cantidad de lípidos en comparación

con los individuos de su misma especie en estado salvaje (46) debido a la dieta con la que son alimentados, así como al menor movimiento realizado por los peces durante su crecimiento.

2.3.2 Prooxidantes endógenos

Son sustancias que se encuentran en el músculo y que catalizan la oxidación lipídica facilitando la incorporación del oxígeno en el lípido o incrementando la cantidad de radicales libres que pueden iniciar o propagar la oxidación. Como se muestra en la Figura 2, los compuestos prooxidantes pueden clasificarse dentro de dos grupos: los enzimáticos y los no enzimáticos.

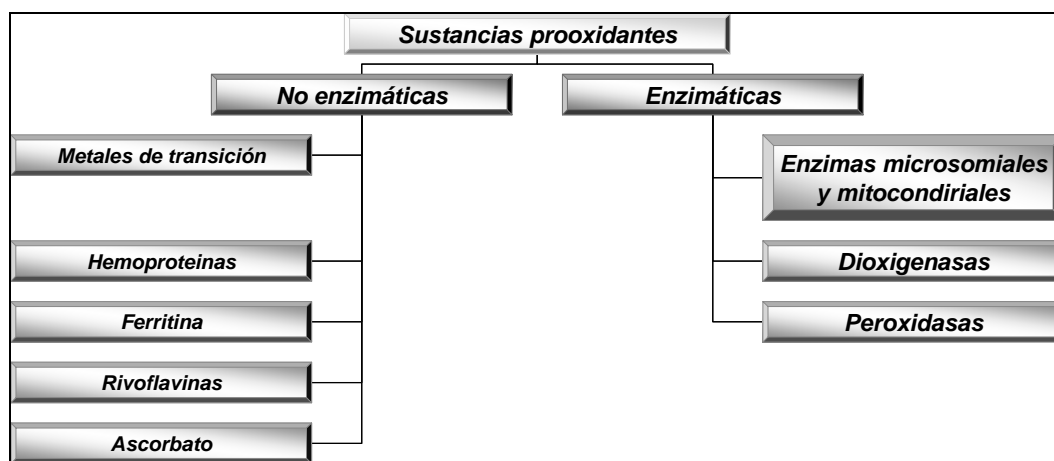


Figura 2: Compuestos presentes en el músculo de pescado con actividad prooxidante

Prooxidantes no enzimáticos

- Dioxigenasas:

Las dioxigenasas son enzimas que catalizan reacciones en las que una molécula de oxígeno se incorpora a un ácido graso. *In vivo*, estas enzimas son las encargadas de la síntesis de los eicosanoides que los organismos utilizan para multitud de funciones, entre las que se encuentran la participación en procesos de inflamación en la respuesta inmune. Tras la muerte del pescado, su actividad se desestabiliza, y participan de forma más intensa en el proceso de oxidación lipídica del músculo (47). Se ha observado la presencia de lipoxigenasas, un tipo de dioxigenasas, en las branquias (48) y en la piel del pescado (49). Su actividad tiene importancia en la oxidación de los lípidos del

pescado fresco ya que la cocción y las operaciones de congelado/descongelado disminuyen su actividad (11).

- Peroxidasas

Son enzimas capaces de catalizar la iniciación de la oxidación lipídica en presencia de H_2O_2 y haluros tales como yoduro o bromuro (47). Este proceso oxidativo podría ser importante durante el procesamiento del pescado, pues las mieloperoxidasas se localizan en la sangre y pueden estar en contacto con los PUFA's durante las etapas de procesamiento.

- Enzimas microsomiales y mitocondriales

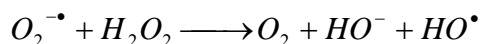
Son sistemas asociados a los microsomas y a las mitocondrias que catalizan la formación de hierro de bajo peso molecular (LMW-Fe) y radicales libres. Estos sistemas están basados en la generación de un radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), a través de NADPH o NADH, que reduce ADP-férrico a ADP-ferroso (50).

Prooxidantes no enzimáticos

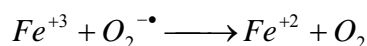
- Metales de transición

Los metales de transición reaccionan con especies oxigenadas para dar lugar a sustancias reactivas de oxígeno (ROS). Cuantitativamente, el principal metal de transición en el pescado es el hierro, aunque el cobre también puede tener cierta contribución en los productos pesqueros. El hierro puede encontrarse asociado a pigmentos, proteínas y metabolitos de bajo peso molecular (51).

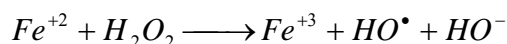
El radical hidroxilo (OH^{\bullet}), que está considerado como uno de los principales iniciadores de la oxidación lipídica en tejidos biológicos (27), se produce mayoritariamente por la fragmentación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este mecanismo es conocido como la reacción de Haber Weiss:



La reacción es muy lenta, pero esta catalizada por el hierro. El primer paso del ciclo catalítico implica la reducción del ión férrico a ferroso:

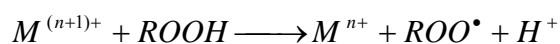
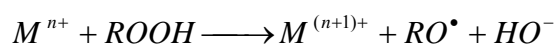


En segundo paso, el hierro ferroso reacciona con peróxido de hidrógeno para dar lugar al radical hidroxilo. Ésta es la denominada reacción de Fenton:



El hierro ferroso descompone más eficazmente hidroperóxidos que en estado férrico (52). El Cu^{+} también puede ser un activador importante de la reacción de Fenton en el músculo de pescado (53).

Los metales de transición también pueden estimular la reacción de los lípidos descomponiendo hidroperóxidos ya formados para generar radicales libres (35).



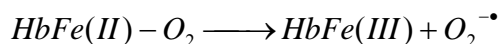
- Hemoproteínas

Las hemoproteínas, hemoglobina y mioglobina, son consideradas las mayores catalizadoras de la oxidación lipídica en especies grasas como la caballa, el jurel, el atún o la sardina (33). La hemoglobina tiene la función biológica de transportar el oxígeno desde los órganos respiratorios hasta el músculo mientras que la mioglobina se encarga del almacenamiento del oxígeno captándolo de la hemoglobina cuando la sangre llega al músculo, debido a su mayor afinidad, actuando como aceptor y reserva de O_2 . La hemoglobina se encuentra tanto en músculo rojo como en blanco. Sin embargo, la mioglobina solo se encuentra en el músculo rojo, donde se localiza el metabolismo aeróbico. La hemoglobina y la mioglobina están formadas por 4 y 1 grupos hemo, respectivamente. El grupo hemo es el grupo prostético de la proteína al cual se une el O_2 , y está formado por una porfirina que posee un átomo de hierro unido a 4 átomos de nitrógeno. Cuando una molécula de oxígeno está enlazada al hierro, la proteína se denomina oxihemoglobina y oximioglobina mientras que las moléculas sin oxígeno enlazado se denominan desoxihemoglobina y desoximioglobina, respectivamente (54). Cuando el hierro se encuentra en estado férrico, a las proteínas se las denomina metahemoglobina y metamioglobina. En el músculo, la hemoglobina y la mioglobina se

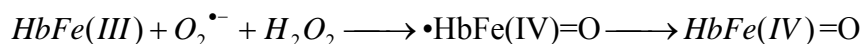
encuentran inicialmente oxigenadas, pero durante el almacenamiento y procesamiento se oxidan y liberan el oxígeno.

Las hemoproteínas pueden promover la oxidación lipídica en el músculo de pescado por diversos mecanismos.

- Descomponiendo hidroperóxidos y generando radicales libres (55).
- Actuando como fotosensibilizadores del oxígeno. En este proceso, las hemoproteínas son excitadas tras la absorción de la luz pasando a un estado excitado, capaz de convertir el oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$) a oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) que se incorpora rápidamente a una molécula de PUFA's generando un hidroperóxido lipídico (56).
- Las hemoproteínas contenidas en el músculo pueden autooxidarse pasando el átomo de hierro del grupo hemo de ferroso a férrico, dando lugar a la formación de metahemoproteínas y al radical superóxido.



- Por otro lado, la metahemoglobina puede ser activada por reacción con el H_2O_2 para dar lugar a la formación de perferrilhemoglobina, radical muy inestable que se reduce rápidamente a ferrilhemoglobina. El mismo mecanismo sigue la metamioglobina para dar la ferrilmioglobina (57).



Las especies perferrilo son capaces de iniciar la oxidación lipídica mediante la abstracción de un átomo hidrógeno a un PUFA (58). Diversos estudios sugieren que, además del H_2O_2 , los hidroperóxidos lipídicos estarían implicados en el mecanismo prooxidante de la metahemoglobina (50).

- Las hemoproteínas pueden liberar grupo hemo que, debido a su carácter apolar, se intercala en las membranas fosfolipídicas mediante interacciones hidrofóbicas (59). El grupo hemo puede actuar como iniciador de la oxidación lipídica mediante la abstracción de átomos de hidrógeno o catalizando la descomposición de hidroperóxidos (58), tal y como se muestra en la Figura 3.

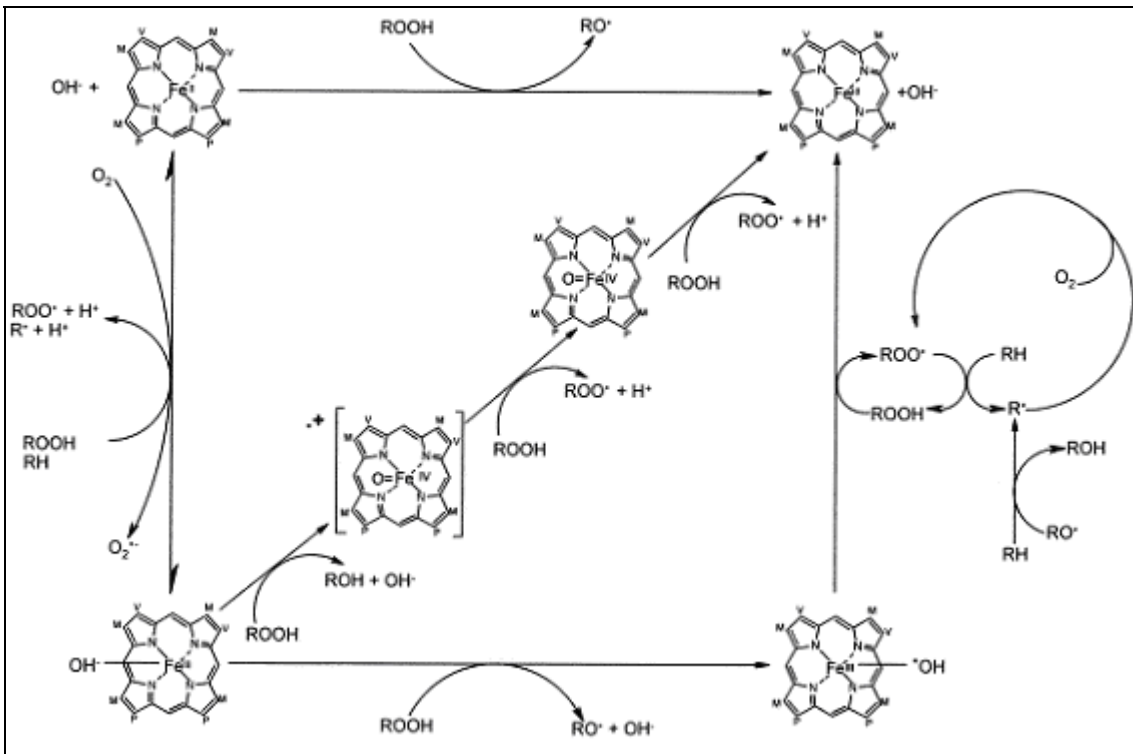


Figura 3: Reacciones del grupo hemo con hidroperóxidos y radicales lipídicos.

- Ferritina

La ferritina, con un peso de 450kDa, es una proteína encargada de almacenar hierro en las células hasta que es necesitado en los procesos biosintéticos de las mismas. Este hierro puede ser liberado en presencia de especies reductoras como el anión superóxido, ascorbato o grupos tioles (45). Se ha observado que la liberación de hierro procedente de la ferritina durante el almacenamiento de músculo de pavo puede iniciar la oxidación lipídica de los fosfolípidos de membrana (60).

- Riboflavinas

La riboflavina, o vitamina B₂, es un fotosensibilizador que puede catalizar la oxidación lipídica. La riboflavina actúa con los lípidos por transferencia de un electrón o átomo de hidrógeno, para formar un radical que pueda reaccionar con el oxígeno (29). La reacción fotosensible no es inhibida por sustancias que rompen la cadena de formación de radicales libres. Además la riboflavina también puede generar oxígeno singlete, que reacciona directamente con los dobles enlaces de los PUFAs (61).

- Ascorbato

El ascorbato es el anión del ácido ascórbico que se genera a pH fisiológico. Este anión puede provocar la reducción del hierro férrico a ferroso, mucho más activo descomponiendo hidroperóxidos (52). Frecuentemente se ha asociado la actividad del ascorbato a su concentración, afirmando que puede ser antioxidante cuando se encuentra a altas concentraciones y prooxidante cuando se encuentra a concentraciones reducidas (45).

2.3.3 Antioxidantes endógenos

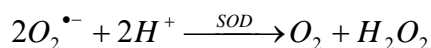
La alta susceptibilidad de los PUFAs a ser oxidados hace que el pescado posea una serie de mecanismos endógenos que eviten su oxidación excesiva. Estos compuestos pueden ser clasificados en dos grupos. El primero está formado por compuestos que neutralizan sustancias que catalizan el inicio y la propagación de la oxidación lipídica, denominados antioxidantes preventivos. El segundo grupo está formado por compuestos que reaccionan directamente con radicales libres inhibiendo directamente la etapa de iniciación y propagación y se denominan verdaderos antioxidantes.

Antioxidantes preventivos

A su vez, estos compuestos pueden clasificarse en compuestos enzimáticos, como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatona, peroxidasa o ferroxidasa, y no enzimáticos como los carotenoides, el ascorbato, el ácido úrico o los fosfatos.

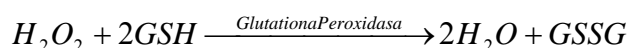
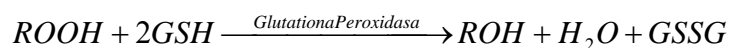
- Superóxido Dismutasa (SOD)

Las células se encuentran protegidas contra el daño provocado por el exceso de anión superóxido producido en las células aeróbicas a través de la enzima superóxido dismutasa. Esta enzima cataliza la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, a través de un ión metálico que puede ser hierro, zinc o cobre.

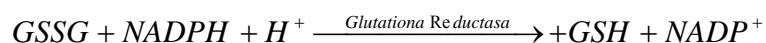


- Glutathione Peroxidase

Es la enzima que cataliza la reducción de hidroperóxidos a alcoholes y de peróxido de hidrógeno a agua por oxidación de la glutathione (GSH).



La glutathione oxidada (GSSG) puede ser reducida de nuevo a GSH, reacción catalizada por la enzima glutathione reductase y el NADPH como agente reductor.



Los hidroperóxidos presentes en los fosfolípidos de las membranas son directamente reducidos por la glutathione peroxidase que se encuentra parcialmente unida a los lípidos de membrana.

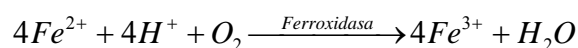
- Catalasa

La catalasa es una enzima situada en los peroxisomas de las células. Descompone el peróxido de hidrógeno por dismutación del oxígeno en agua y oxígeno molecular. La catalasa puede proteger a las células cuando el peróxido de hidrógeno difunde libremente a través de la membrana, aunque habitualmente es degradado por la glutathione peroxidase.



- Ferroxidasas

Son enzimas que catalizan la oxidación del óxido ferroso a férrico en presencia de oxígeno.



- Fosfatos

La composición y el nivel de fosfatos juegan un papel muy importante en la disminución de la oxidación lipídica (62). Los fosfatos tienen la capacidad de quelatar iones metálicos (63) e incrementar el pH, que disminuye la actividad prooxidante de las hemoproteínas.

Dentro de los inhibidores preventivos existen otro tipo de compuestos no enzimáticos, como es el ascorbato, los carotenoides o el ácido úrico. El ascorbato puede actuar como inhibidor preventivo, debido a su capacidad para quelatar metales y para inhibir la autooxidación de las proteínas (64). Los carotenoides son los desactivadores más importantes del oxígeno singlete, que puede reaccionar directamente con el doble enlace (29). El ácido úrico es un antioxidante soluble en agua que inhibe la oxidación lipídica por unirse a átomos de hierro y cobre, convirtiéndolos en complejos inactivos, y por neutralizar oxidantes como los radicales hidroxilo y peroxilo o el oxígeno singlete (29).

Verdaderos antioxidantes

Son compuestos que intervienen en la cadena de formación de los radicales libres, convirtiendo a los hidroperóxidos y a los radicales en compuestos más estables. La efectividad de estos antioxidantes es dependiente de sus propiedades químicas, como las energías de enlace, la posibilidad de formación de distintas formas resonantes del radical formado y la susceptibilidad a la oxidación, que viene dada por el valor de su potencial de reducción.

- Tocoferol

El tocoferol es el principal antioxidante lipofílico presente en el músculo de pescado. Su importancia se debe a que se encuentra en contacto con las membranas celulares, las cuales son muy susceptibles a desarrollar la oxidación lipídica. Existen cuatro isómeros diferentes (α , β , δ , γ) que se diferencian en el número y posición de los grupos metilo enlazados al anillo fenólico. El α -tocoferol es el isómero mayoritario presente en los productos marinos (65-67).

La actividad antioxidante del tocoferol se atribuye a la donación de dos electrones, generándose en el proceso dos especies lipídicas no radicalarias y la tocoferolquinona, a través del radical tocoferilo (29). El radical tocoferilo al encontrarse estabilizado por resonancia no interviene en la generación de nuevos radicales lipídicos (68). Otro de sus mecanismos antioxidantes ocurre a través de la formación de una forma oxidada del α -tocoferol, la tocoferolquinona, la cual compite con el oxígeno por los radicales alquilo de los ácidos grasos insaturados. Esta competición entre oxígeno y α -tocoferolquinona solo es considerable a bajas presiones de oxígeno, ya que los radicales alquilo reaccionan más rápido con el oxígeno.

- Ascorbato

El ascorbato es el principal antioxidante hidrosoluble presente en el músculo de pescado. A pH fisiológico el ácido ascórbico se encuentra en forma de anión, pudiendo ceder dos electrones, mediante una reacción reversible, para dar el ácido dehidroascórbico a través del radical ascorbilo (Figura 4). El ácido ascórbico es un excelente neutralizador de radicales libres, como hidroxilo o peroxilo, en medios acuosos.

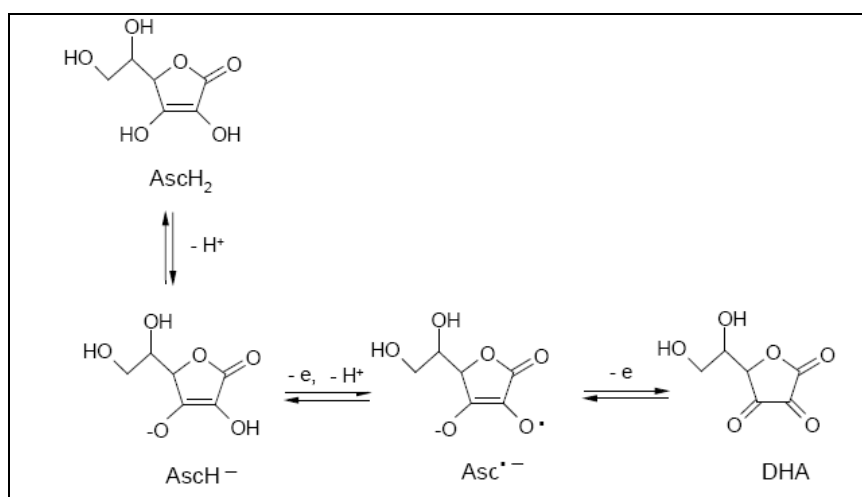


Figura 4: Oxidación reversible del ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico

Además, el ascorbato también puede actuar como antioxidante quelatando metales, atrapando oxígeno singlete y mediante la reducción de los hidroperóxidos a alcoholes que son más estables y no continúan las reacciones radicalarias (29).

El ascorbato es incapaz de inhibir la oxidación lipídica cuando los radicales libres se generan en la fase lipídica. Sin embargo, el ascorbato puede reaccionar con los radicales tocoferoxilo generados a partir del tocoferol, y localizados cerca de la interfase lípido-agua, regenerándolos y provocando una sinergia en la actividad antioxidante de ambos compuestos (69).

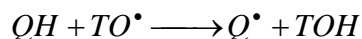
- Glutathiona

El péptido $\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$ se denomina glutathiona. Desde el punto de vista redox, la glutathiona reducida (GSH) es capaz de ceder electrones, desde su grupo sulfidril (SH), a una especie oxidada como puede ser un hidroperóxido lipídico, funcionando así como un potente agente antioxidante y rindiendo el producto oxidado (GSSH). La glutathiona

también interviene en las reacciones catalizadas por la glutatona peroxidasa, como donante de electrones.

- Ubiquinol

El ubiquinol es un compuesto liposoluble que se encuentra en la cadena de transporte de electrones de la membrana interna de la mitocondria. El ubiquinol puede ceder dos electrones para dar lugar a su forma oxidada, la ubiquinona, a través de un solo paso o mediante dos etapas secuenciales con la semiubiquinona como intermediario (70). El poder antioxidante de este compuesto está asociado a su capacidad de regenerar el tocoferol (71, 72).



La ubiquinona puede ser también regenerada por el ascorbato (73) o el NADH (74).

- Carotenoides

Los carotenoides son los pigmentos responsables de la coloración de la piel y caparazón de diversas especies de pescados y mariscos. La actividad antioxidante de los carotenoides se basa en la desactivación de los radicales en especies no radicalarias (45). El β -caroteno o el licopeno son carotenoides con este tipo de propiedades antioxidantes.

3. CAMBIOS POST-MORTEM QUE AFECTAN A LA SUSCEPTIBILIDAD OXIDATIVA.

Después de la muerte del pez, se producen una serie de modificaciones que afectan a los compuestos prooxidantes y antioxidantes del músculo. Asimismo, en tejidos musculares, durante su conservación y almacenamiento, se modifican las concentraciones de prooxidantes y antioxidantes, y se producen cambios que afectan a su susceptibilidad oxidativa. En la Tabla 2 se enumeran los cambios post-mortem del músculo de pescado más importantes en el desarrollo de la oxidación lipídica.

Tabla 2: Resumen de los cambios postmortem del músculo de pescado que afectan al desarrollo de la oxidación lipídica

- Imposibilidad de las células musculares para mantener los gradientes de calcio
- Incremento de la concentración de ácidos grasos libres
- Reducción del pH
- Oxidación de las hemoproteínas
- Pérdida de compuestos reductores: Ascorbato, NAD(P)H, glutatona
- Pérdida de antioxidantes de la membrana: tocoferol, ubiquinol

En condiciones post mortem, se anulan los mecanismos de obtención de energía de las células, y ello provoca que no sea posible el mantenimiento de los gradientes de iones en las mismas. En estas condiciones el calcio, ión activador de lipasas, fosfolipasas y proteasas, es liberado al citoplasma, y ello provoca un aumento de la actividad hidrolítica sobre los lípidos, y por tanto, de la concentración de los ácidos grasos libres. Los ácidos grasos libres muestran una susceptibilidad mayor a la oxidación respecto a la de los lípidos no hidrolizados (51).

La acumulación de ácido láctico, generado por el proceso de respiración anaerobia o glucólisis, origina la reducción del pH del músculo durante su almacenamiento (75). Esta modificación post mortem del valor de pH puede resultar trascendental, ya que se ha observado que un leve descenso del valor de pH aumenta dramáticamente la actividad prooxidante de las hemoproteínas de pescado (76). Además, las hemoglobinas de las distintas especies de pescado parecen caracterizarse por marcadas diferencias en su actividad promotora de la oxidación (77).

Durante el almacenamiento del músculo se produce un consumo secuencial de las especies antioxidantes. La pérdida de las sustancias antioxidantes origina finalmente un rápido incremento de la velocidad de la oxidación lipídica, dándose por finalizado el periodo de inducción de la oxidación. Además del balance endógeno del propio músculo, existen varios factores que promueven o retardan la oxidación de los lípidos. Estos pueden ser intrínsecos, propios del tejido, o extrínsecos, procedentes del ambiente y condiciones que rodean al alimento. Entre los factores extrínsecos está la temperatura de almacenamiento. Un descenso de la temperatura ralentiza las reacciones de oxidación además de la inmovilización de agentes catalíticos que aceleran los cambios post mortem. La naturaleza del ácido graso y su grado de insaturación también afectan a la oxidación de los lípidos en el pescado. A mayor grado de insaturación, mayor es la probabilidad de que la autooxidación ocurra. La presencia de metales, como hierro y cobre, ya sea proveniente de la composición del pescado, del agua o equipos de procesado puede acelerar la reacción de oxidación.

4. MÉTODOS UTILIZADOS PARA EVITAR LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN PESCADO.

Una de las estrategias más importantes utilizadas para preservar la calidad lipídica en el pescado o en productos derivados de la pesca es evitar su oxidación. Los procedimientos encaminados a ello pueden agruparse dependiendo del producto, que puede ser pescado procesado o no procesado. Los métodos más utilizados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Estrategias utilizadas para preservar el pescado y productos derivados de la pesca de las reacciones de deterioro.

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Disminución de la T^a de almacenamiento• Aplicación de condiciones anaerobias y de atmósferas modificadas• Eliminación de prooxidantes a través del sangrado y el eviscerado• Lavado del pescado• Microencapsulado de los aceites de pescado en alimentos enriquecidos• Uso de aditivos antioxidantes |
|--|

La disminución de la temperatura de almacenamiento, además de ralentizar y llegar a detener el crecimiento microbiano, también se ha mostrado eficaz inhibiendo la oxidación lipídica (78). Sin embargo, la continua formación de ácidos grasos libres a temperaturas inferiores a 0°C, debido a la hidrólisis de los triglicéridos por las lipasas y de los fosfolípidos por las fosfolipasas (29) y a la mayor susceptibilidad de los ácidos grasos libres a oxidarse, provoca que la reacción no se detenga completamente. Además, el almacenamiento del pescado a temperaturas ligeramente inferiores al punto de fusión del agua provoca un ligero aumento en el desarrollo de la rancidez debido a complejos procesos que eliminan agua circulante por cristalización y provocan un aumento en la concentración de metales catalíticos (29). El desarrollo de la rancidez en pescado almacenado también puede ser retardado por el glaseado con una fina capa de hielo.

El empaquetamiento es un sistema de envasado diseñado para preservar pescado de microorganismos e inhibir cambios, tanto físicos como químicos. Las dos aplicaciones más frecuentes en el empaquetado son el vacío y el uso de atmósferas modificadas. El envasado al vacío ha demostrado aumentar el periodo de vida útil del pescado, debido al retraso en la aparición de la rancidez ocasionado por la eliminación del O₂ (79). El uso

de atmósferas modificadas se basa en el envasado del producto en presencia de una mezcla de gases químicamente poco reactivos como son el dióxido de carbono (CO₂) y el nitrógeno (N₂) (80). Se ha observado que es posible aumentar el periodo de vida útil del pescado almacenado bajo atmósfera modificada hasta un 30% respecto a su almacenamiento solamente refrigerado.

El eviscerado y el desangrado son técnicas de conservación usadas más frecuentemente en la flota que no descarga su captura diariamente. Aunque la principal finalidad del eviscerado es retrasar el crecimiento microbiano, se ha observado una disminución en la velocidad de hidrólisis en los triglicéridos, que disminuye la velocidad de la oxidación lipídica debido a la eliminación de las lipasas presentes en el tracto digestivo (11). El desangrado es otra técnica que comúnmente acompaña al eviscerado. Se ha observado que la eliminación de la hemoglobina, considerada como el mayor prooxidante presente en el pescado, incrementa el periodo de vida útil del pescado (81). El desangrado suele preceder al eviscerado, y la eficacia de éste es mayor si se realiza cuando el pez todavía está vivo.

El lavado del pescado es un procedimiento que elimina compuestos prooxidantes presentes en el músculo como hemoproteínas o trazas de metales, aunque también puede promover la disminución de compuestos que protegen a los lípidos contra la oxidación, como es el ácido ascórbico.

El microencapsulado es una técnica utilizada para introducir ingredientes líquidos, como el aceite de pescado, en alimentos. Se ha observado que el aceite de pescado añadido a alimentos mediante microcápsulas muestra una mayor estabilidad oxidativa que el añadido directamente (82). Los PUFAs encapsulados desarrollan más lentamente la oxidación lipídica debido a que:

- Se previene el contacto del aceite con el oxígeno.
- Se previene el contacto del aceite con iones metálicos.
- Se protege al aceite de la exposición a la luz.

Aunque la microencapsulación previene por sí sola la oxidación lipídica, la microencapsulación junto con antioxidantes como el tocoferol (83), el AEDT (84) o el ácido ascórbico (85), o la incorporación de antioxidantes al recubrimiento de la microcápsula también es habitual para asegurar la máxima protección durante el procesado y el almacenamiento de los ingredientes bioactivos encapsulados.

El uso de compuestos antioxidantes en pescado no procesado se basa únicamente en su aplicación superficial debido a que es donde se produce el contacto con el oxígeno.

En los últimos años se han desarrollado una gran variedad de envases que incorporan compuestos antioxidantes capaces de ser liberados gradualmente sobre el músculo de pescado (86). El enriquecimiento de la dieta del pescado con antioxidantes, como el tocoferol, ha mostrado un incremento de los niveles endógenos de los mismos que provoca una reducción en su velocidad de oxidación y promueve la conservación del pescado durante su almacenamiento (87, 88). Se ha observado que la suplementación de tocoferol en la dieta es más efectiva en la inhibición de la oxidación lipídica que su adición post-mortem (89). Recientemente varios trabajos han mostrado la eficacia de la adición de antioxidantes en productos transformados, como productos congelados elaborados a base de pescado picado (90), fileteado (91) o surimis (92).

5. USO DE ANTIOXIDANTES COMO ESTRATEGIA PARA INHIBIR LA OXIDACIÓN LIPÍDICA

Como se ha mostrado anteriormente, el uso de antioxidantes es un mecanismo ampliamente utilizado en la conservación del pescado y productos derivados de la pesca. La aplicación de estos compuestos puede ser directa, sobre el músculo y los aceites de pescado, o indirecta, a través de materiales utilizados en el envasado que incorporan antioxidantes.

Para que un compuesto sea considerado antioxidante, debe de intervenir en algún paso de la reacción de oxidación lipídica, ralentizando la aparición de productos primarios, secundarios y olores desagradables asociados a la rancidez. Al igual que se ha mencionado en la sección anterior, se pueden clasificar a los distintos compuestos con capacidad antioxidante como inhibidores de la iniciación o antioxidantes preventivos y como inhibidores de la propagación o verdaderos antioxidantes.

- Antioxidantes preventivos. Son compuestos capaces de inactivar moléculas inductoras de la oxidación lipídica. Dentro de esta categoría se encuentran:
 - Inactivadores de metales. Son compuestos que inactivan o quelatan metales con actividad prooxidante a través del cambio en su potencial redox o inhibiendo las reacciones de descomposición de hidroperóxidos catalizadas por estos iones.
 - Estabilizadores de hidroperóxidos. Estos compuestos son principalmente agentes reductores que convierten los hidroperóxidos en alcoholes, compuestos más estables.
 - Fotoestabilizadores. Son compuestos que inhiben la oxidación lipídica promovida por el oxígeno singlete. Estos compuestos actúan como “quenchers” transformando el oxígeno singlete en oxígeno triplete.
 - Regeneradores de antioxidantes. Son compuestos que actúan en general reduciendo un compuesto, que ya ha sido utilizado como antioxidante, para que pueda seguir actuando.

- Inhibidores de la propagación. Son compuestos capaces de reaccionar con los radicales lipídicos, formando compuestos más estables, e interrumpiendo así la etapa de propagación.

No todos los compuestos con propiedades antioxidantes pueden ser utilizados como aditivos. Además de intervenir en la reacción de la oxidación lipídica, reaccionando directamente con radicales lipídicos o con compuestos que puedan generar radicales lipídicos, este tipo de compuestos deben de cumplir otra serie de requisitos:

- No deben presentar ningún peligro para el consumidor en las concentraciones usadas.
- No deben alterar el sabor, textura, olor o color del alimento sobre el que se apliquen.
- Deben ser estables a cualquier proceso y/o tratamiento que se realice al alimento.
- El precio del aditivo no debe ser significativo en el precio final del producto.
- En caso de degradación del aditivo, los subproductos formados no deben ser tóxicos y no deben influir en las propiedades organolépticas del alimento.
- El aditivo debe ser estable y no reaccionar con compuestos presentes en el pescado o producto pesquero, tanto a la temperatura de almacenamiento como a la temperatura de procesado. En el caso de interacción, los productos formados no deben ser tóxicos o modificar las propiedades organolépticas del alimento.

Los compuestos susceptibles a ser utilizados como aditivos antioxidantes pueden ser tanto de origen natural como de origen sintético. Dentro de los compuestos de origen sintético pueden encontrarse aquellos que, aunque se encuentran en la naturaleza, pueden ser sintetizados artificialmente en el laboratorio, y aquellos que no se encuentran en la naturaleza.

5.1 Antioxidantes sintéticos

- Butil-hidroxianisol (BHA)

El BHA es un antioxidante sintético que se ha utilizado desde los años 40 como aditivo alimentario. Resulta muy eficaz en las grasas de fritura, ya que no se descompone o evapora, protegiendo al producto frito. Su utilización está autorizada en la Unión Europea y en Estados Unidos pero no en Japón, por ejemplo. Se han

encontrado que dosis elevadas BHA en ratas producen la proliferación anormal de células en ciertos puntos de su tubo digestivo (93). En España la dosis máxima de BHA permitida son 200 mg/kg grasa (94).

- Butil-hidroxitolueno (BHT)

Antioxidante de origen sintético que es frecuentemente utilizado con el BHA debido a que se han observado sinergias en el efecto de estos antioxidantes cuando se aplican juntos. A dosis altas se ha observado que provoca hemorragias y afecta a la reproducción de las ratas (95).

Otro tipo de antioxidantes sintéticos ampliamente utilizados son la terbutilhidroquinona (TBHC), el palmitato de ascorbilo, los polifosfatos o el propil galato. Aunque el propil galato usado como antioxidante es sintetizado en laboratorios, puede obtenerse también de forma natural a partir de las vainas de la fruta procedente del árbol de la tara (*Caesalpinia spinosa*).

5.2 Antioxidantes Naturales

- Tocoferoles

Los tocoferoles son los antioxidantes naturales mayoritarios presentes en aceites vegetales. Estos antioxidantes se han mostrado eficaces inhibiendo la oxidación de aceites de pescado (96). Sin embargo, en presencia de trazas de hierro o cobre el tocoferol no inhibe efectivamente el desarrollo de la oxidación lipídica (97). En estos casos, una mezcla de tocoferol y AEDT consigue inhibir completamente la oxidación lipídica en aceites, aunque no se ha observado sinergia en el efecto antioxidante entre ambos compuestos (98). En alimentos, la eficacia de los tocoferoles es muy baja y exhiben mayor eficacia en sistemas emulsionados de aceite en agua que en sistemas monofásicos. Como se ha indicado anteriormente, el enriquecimiento de la dieta del pescado en tocoferol es mucho más eficaz que la aplicación del antioxidante en músculo post-mortem, debido a que *in vivo* el tocoferol se encuentra situado en las membranas biológicas, mientras que su distribución no es tan eficaz cuando se adiciona en el músculo (99). La actividad antioxidante de los tocoferoles es mayor para el isómero δ y va descendiendo hasta el isómero α (100). La aplicación de tocoferol junto a un 0.5% de fosfolípidos, como fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, provoca un importante efecto sinérgico en la estabilización de aceites de pescado (101).

- Ácido Ascórbico

El ácido ascórbico utilizado como antioxidante es un compuesto que puede presentar un comportamiento dual. Como se ha explicado anteriormente, en sistemas que contienen iones metálicos y a bajas concentraciones muestra un efecto prooxidante. Se ha observado que el ascorbato muestra un efecto antioxidante en el músculo de bacalao cuando se emplea en concentraciones superiores de 1000 ppm, mientras que a concentraciones inferiores a 500 ppm tiene efecto prooxidante (102). En sistemas bifásicos de aceite de pescado y agua, la aplicación conjunta de ácido ascórbico con tocoferol produce un efecto sinérgico (103).

- Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son estructuras químicas formadas por un anillo aromático de benceno unido a uno o más grupos hidroxilo. Estos compuestos se encuentran presentes en todo el reino vegetal, siendo frecuente encontrarlos conjugados con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilo, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre el azúcar y un anillo del carbono aromático. Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en función de su estructura química básica (104) como se puede ver en la Tabla 4. Algunas veces, pueden encontrarse unidos a

Tabla 4: Familias de compuestos fenólicos

Numero de átomos de Carbono	Esqueleto	Clase
6	C ₆	Fenoles simples
7	C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos
8	C ₆ -C ₂	Acetofenonas, ácido fenil Acético
9	C ₆ -C ₃	Ácido hidroxicinámico, coumarinas, isocoumarinas, poliprenos
10	C ₆ -C ₄	Naftoquinonoas
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos, antroquinonas
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides, isoflavonoides
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanós, neolignanós
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides
N	(C ₆ -C ₃) _n	Ligninas
	(C ₆) _n	Catecolamina
	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos condensados

ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y otros compuestos fenólicos (105).

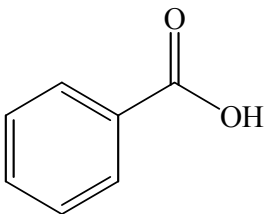
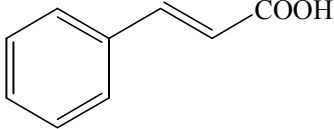
Los compuestos polifenólicos constituyen uno de los grupos de antioxidantes más abundantes y ampliamente distribuidos, con más de 8000 estructuras polifenólicas conocidas (106). Son los productos del metabolismo secundario de las plantas y se encuentran en raíces, tallos, troncos, hojas y frutos, donde ejercen una función protectora ante la radiación UV u otras situaciones de estrés (107).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se basa en su capacidad secuestradora de radicales libres (scavengers), quelatante de iones metálicos y donadora de electrones (108). Su estructura química es la ideal para reaccionar con los radicales libres y formar un radical intermedio más estable y menos reactivo, ya que la presencia de anillos aromáticos y grupos hidroxilo permite que se deslocalicen los electrones (109).

❑ *Fenoles simples*

Los fenoles simples son un grupo de compuestos que se caracterizan por la presencia de un esqueleto fenólico: un anillo bencénico con un grupo hidroxilo. Los ácidos fenólicos simples más abundantes en la naturaleza son derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico (Tabla 5). Los ácidos fenólicos se encuentran de manera habitual conjugados, más frecuentemente como ésteres que como glicósidos.

Tabla 5: Estructuras de ácidos fenólicos simples encontrados en frutas y verduras.

Estructura Molecular	Compuestos representativos	Fuentes en la dieta
<p><u>Ácido Benzoico</u></p> 	<p>Ácido p-hidroxibenzoico Ácido vainílico Ácido siringico Ácido gálico</p>	<p>Tomate, té verde, zanahoria Tomate, vino Té verde Fresa, zumo de uva</p>
<p><u>Ácido cinámico</u></p> 	<p>Ácido p-cumárico Ácido ferúlico Ácido cafeico Ácido rosmarínico</p>	<p>Uva blanca, tomate, repollo Trigo, maíz, arroz Uva blanca, olivas, café Pera Uva, Pomelo Aceite de oliva, jengibre</p>

Estos compuestos se han utilizado como antioxidantes de los productos pesqueros. Se ha sugerido que el mecanismo de protección que ejerce el aceite de oliva en atún enlatado es debido a que los fenoles complejos se hidrolizan durante el procesamiento térmico de la conserva, y que la mayor solubilidad de los fenoles simples en fases acuosas permite que se sitúen en la interfase lípido-agua, lugar donde tiene lugar la oxidación (110, 111). La adición de ácido cafeico a músculo de pescado se mostró muy efectiva regenerando el tocoferol localizado en las membranas celulares. A su vez, el ácido cafeico fue eficazmente regenerado por el ácido ascórbico (112). El hidroxitirosol, el fenol simple más abundante en aceite de oliva, inhibió eficazmente la oxidación lipídica en aceite de hígado de bacalao, en una emulsión de aceite de hígado de bacalao y en músculo picado de jurel (113).

□ Flavonoides

La familia de compuestos polifenólicos más común es la del grupo de los flavonoides, de la que se conocen más de 5000 estructuras diferentes (114). Los flavonoides son polifenoles de bajo peso molecular formados por la combinación de derivados de fenilalanina y el ácido acético. En la figura 5 se observa la estructura común de un flavonoide, caracterizada por tener un esqueleto difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$) formado por 3 anillos conocidos como A, B y C.

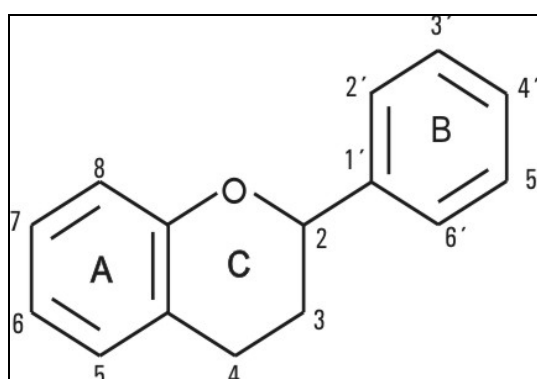
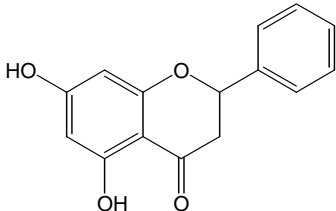
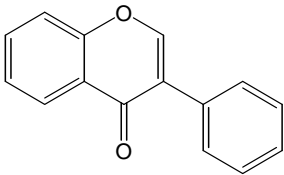
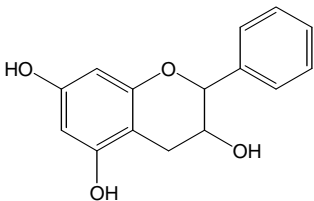
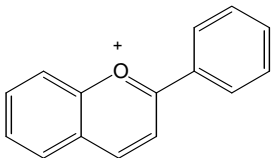
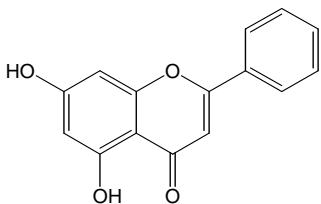
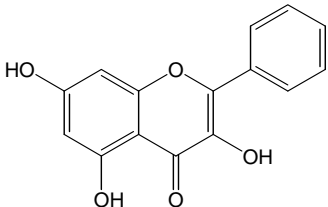


Figura 5: Estructura común de un flavonoide

Las diferencias entre los diversos grupos de flavonoides se establecen por el grado de aromaticidad (dobles enlaces conjugados), el patrón de hidroxilación (orden y número) o el tipo de sustituciones (glicosilación, metilación....). Las moléculas de flavonoides no unidas a un glúcido se conocen como agliconas, mientras que las formas glicosiladas se llaman glicósidos. Las variaciones estructurales en los anillos permiten subdividir a

los flavonoides en 6 subclases: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanoles y antocianidinas.

Tabla 6: Estructuras de flavonoides encontradas en frutas y verduras.

Estructura Molecular	Compuestos representativos	Fuentes en la dieta
<p><u>Flavanonas</u></p> 	<p>Naringenina Naringina Taxifolina</p>	<p>Cítricos Piel de cítricos Cítricos</p>
<p><u>Isoflavonas</u></p> 	<p>Genisteina Genistina</p>	<p>Haba de soja Haba de soja</p>
<p><u>Flavanoles</u></p> 	<p>Epicatequina Catequina Catequin Galato Galocatequina Epigallocatequina Galocatequin Galato</p>	<p>Té verde, Té negro, vino tinto</p>
<p><u>Antocianidinas</u></p> 	<p>Apigenidina Cianidina Malvidina</p>	<p>Frutas coloreadas Cerezas, frambuesas, fresa Uva, vino tinto</p>
<p><u>Flavonas</u></p> 	<p>Apigenina Luteolina</p>	<p>Apio, perejil Oliva, cereales</p>
<p><u>Flavonoles</u></p> 	<p>Quercitina Miricetina Kaemferol Rutina Hesperidina</p>	<p>Cebolla, lechuga, fresa, té Uvas, arándanos Endivia, brócoli, uva Vino tinto, piel tomate Naranja</p>

Efectos prooxidantes de los flavonoides

Las mismas propiedades que caracterizan la actividad antioxidante de los flavonoides también provocan que puedan presentar efectos prooxidantes, lo que puede implicar un cierto potencial tóxico (115). Los mecanismos en los que se basa este efecto son la formación de un aroxilo lábil o de un complejo flavonoide-redox lábil (116). Estos mecanismos pueden producir H_2O_2 , que puede provocar la oxidación de la Hb (117), ser sustrato de otros ROS, y liberar iones de Fe^{+2} que catalizan la formación de ROS.

□ Taninos

Los taninos son una variedad de compuestos formados por fenoles unidos mediante enlaces C-C para formar polímeros. Estos polímeros se encuentran en un gran número de alimentos como el té (118), el vino tinto (119), el chocolate (120), en frutas, legumbres y cereales (121). Los taninos se clasifican en taninos hidrolizables y taninos condensados (122). Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos formados por ácido gálico y azúcares simples, mientras que los taninos condensados (también llamados proantocianidinas) son polímeros de flavonoides. Los procianidinas, una subclase de las proantocianidinas, están formadas por unidades de (+)-catequina y (-)-epicatequina. Pazos et al. observaron una significativa inhibición de la oxidación lipídica por oligómeros de catequinas en músculo de jurel (123), aunque la actividad antioxidante de los distintos polifenoles estuvo influenciada por su grado de polimerización y galoización.

6. RESIDUOS AGROALIMENTARIOS COMO FUENTE DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES UTILIZADOS EN ALIMENTACIÓN

Las industrias agrícola y forestal producen al año un gran volumen de residuos, tanto sólidos como líquidos, resultados de los procesos de producción, preparación, y consumo de sus productos. Estos residuos, además de un potencial riesgo medioambiental, representan también un problema económico debido al poco rendimiento que se extrae de ellos y al coste adicional que implica su eliminación (124). El uso de estos residuos o la extracción de subproductos, procedentes de los mismos, a los que se les encuentran nuevas utilidades y pueden ser reaprovechados, suponen una fuente de ingresos que incrementa la rentabilidad de la industria agrícola y forestal.

En muchos procesos agroindustriales y agroforestales, como la elaboración de zumos, vinos o la producción de madera, se generan subproductos y residuos ricos en polifenoles. Como se ha indicado, estas sustancias han despertado el interés tanto de científicos como de la industria por la eficacia reconocida de sus propiedades antioxidantes. La tendencia actual en el uso de antioxidantes combina la predisposición al cambio de compuestos sintéticos por compuestos naturales (29), junto con los efectos de los antioxidantes naturales en la prevención de varias enfermedades asociadas al estrés oxidativo como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (125).

Son muy numerosos los estudios en la última década donde se han obtenido extractos con un alto contenido en antioxidantes procedentes de cortezas de distintos árboles (126, 127), residuos de la piel de la patata (128), alpechines (129), bagazo de manzana (130), semillas y pieles de cítricos (131), serrín (132), pulpa de zanahoria (133) y subproductos del coco (134). Estos tipos de extractos han mostrado una alta eficacia inhibiendo el desarrollo de la oxidación. Entre muchos ejemplos puede citarse el trabajo de Sheabar y Neaman (135), donde extractos de residuos de aceite de oliva retardaron eficazmente la oxidación lipídica en diversos aceites. También, extractos fenólicos obtenidos de pieles de patata fueron empleados con éxito para retardar la oxidación lipídica en aceite de girasol (136). Marinova et al. (137) utilizaron corteza de *Fraxinus ornus* para inhibir la oxidación en aceite de girasol. Luther et al. obtuvieron un extracto antioxidante procedente de semillas de frambuesa que fue capaz de inhibir la oxidación de aceite de pescado (138).

6.1 Residuos vinícolas como fuente de aditivos antioxidantes de origen alimentario.

El bagazo de uva es el residuo constituido por la piel de la uva, pepitas y el raspón de los racimos generados en el proceso de obtención del vino. Estos subproductos agrarios presentan gran importancia debido a que la uva es la fruta más cosechada en el mundo (139), y se estima que cerca del 13% de su peso está constituido por residuos sobrantes en la elaboración de los vinos (140). Por ello, el bagazo de uva ha generado mucho interés con respecto a otros subproductos agrícolas ya que puede obtenerse a muy bajo precio y contiene una alta concentración de compuestos antioxidantes (141).

Los compuestos fenólicos se encuentran principalmente en la piel y la pepita. En la pulpa predominan los ácidos fenólicos simples como el ácido gálico, cafeico, cumárico y ferúlico (142), mientras que la pepita está compuesta por flavonoides del tipo antocianinas, flavanoles, flavonoles glicosilados y flavonoides oligoméricos. La cantidad de polifenoles de la uva depende principalmente de la variedad de la uva, del clima, del terreno y de las prácticas de cultivo. El proceso de producción del vino también provoca diferencias en el contenido fenólico de los residuos generados. Los vinos blancos se obtienen al fermentar el mosto, que es incoloro. Sin embargo, la fermentación de los vinos tintos se produce en presencia de la piel, provocando que adquiera color y un mayor contenido en polifenoles debido a la maceración (143), obteniendo un residuo agrícola con un menor contenido en antioxidantes.

Los extractos de uva han mostrado una elevada eficacia inhibiendo la oxidación lipídica en el músculo de pescado, aceite y emulsiones de aceite de pescado (123, 144). Pazos et al. Utilizaron con éxito distintas fracciones de extractos de uva sobre músculo de pescado congelado (145, 146). Brannann y Mah (147) utilizaron un extracto de semilla de uva para inhibir la formación de hidroperóxidos y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en músculo de carne cruda y cocinada durante su almacenamiento refrigerado y congelado. Karvela et al (148) aplicaron una serie de extractos obtenidos de subproductos de la vinificación para inhibir la oxidación lipídica en liposomas. Además, los extractos de uva son considerados sustancias seguras o GRAS (Generally Recognised as Safe) por la Administración del Alimento y del Medicamento de Estados Unidos (FDA), así como por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (AESA).

7. FACTORES QUE AFECTAN A LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE UN COMPUESTO

La actividad de los distintos compuestos antioxidantes está muy relacionada con diversos factores como su estructura, el medio en el que se encuentran o sus propiedades químicas.

Hay que tener en cuenta que la oxidación es una reacción que ocurre en la superficie de contacto entre dos fases, la acuosa y la lipídica, y depende de diversos factores como la velocidad de difusión del O_2 y su interacción con lípidos insaturados, la presencia de catalizadores, generadores de radicales, la presencia de antioxidantes y su distribución en el sistema en el que se presentan. Los mecanismos clásicos de inhibición de la oxidación lipídica no explican las diferencias en la actividad antioxidante en sistemas acuosos y bifásicos (agua-aceite). Por ello, la actividad antioxidante en estos sistemas debe ser analizada teniendo más en cuenta la polaridad del compuesto.

7.1 Relación estructura-actividad

Si bien, aunque dos compuestos antioxidantes presenten una fórmula molecular similar, la disposición en el espacio de sus grupos funcionales puede hacer variar enormemente su efectividad para inhibir la oxidación. Por ejemplo, en compuestos fenólicos la capacidad quelatante está relacionada con el número de grupos hidroxilos en orto que tiene la molécula (148). La capacidad reductora de estos compuestos puede incrementarse si en la posición “orto” y “para” se introducen grupos donadores de densidad electrónica. Por otro lado, si los grupos introducidos atraen densidad electrónica, disminuye su capacidad reductora (29).

En flavonoides se distinguen tres estructuras que determinan altas propiedades antioxidantes:

- El orto-dihidroxilo del anillo B, conocido como resto catecol.
- El doble enlace de las posiciones 2 y 3 conjugado con el carbonilo C_4 .
- La presencia de hidroxilos en las posiciones 3 y 5.
- Los glicósidos presentan menor actividad reductora que las correspondientes agliconas.
- La presencia de una estructura con 3 hidroxilos en orto, denominada pirogalol, mejora la capacidad donadora de electrones.

- Los restos de ácido gálico mejoran las propiedades para atrapar radicales libres, debido a la presencia del grupo pirogalol en el ácido gálico.

En el caso de las procianidinas, el aumento en el grado de polimerización de 1 a 4 mejora la actividad del flavonoide para atrapar radicales libres, mientras que el incremento de 4 a 10 monómeros por molécula afecta negativamente a la actividad antirradicalaria, probablemente por un incremento del impedimento estérico (149). Vennat et al estudiaron la relación entre capacidad antioxidante frente al anión superóxido y el grado de polimerización de las procianidinas, observando que los dímeros y trímeros de flavonoides resultaron más efectivos que los monómeros para neutralizar dicho radical (150). Por otro lado, los dímeros con uniones C₄-C₆ exhiben mayores propiedades para atrapar radicales libres que las procianidinas con uniones C₄-C₈, debido a la estructura más abierta del dímero con el enlace C₄-C₆. Las proantocianidinas con un grado de polimerización medio (2-3 unidades) y bajo grado de galoización (0,15-0,25 grupos galato por molécula) mostraron los mejores resultados para inhibir la oxidación lipídica en el músculo de pescado (123). La misma tendencia fue observada en emulsiones de aceite de pescado (144).

7.2 Localización-actividad

La distribución de los antioxidantes en los alimentos puede afectar a su efectividad. Una incorporación selectiva de estos compuestos en los sitios donde se desarrolla la oxidación lipídica ha demostrado mejorar su eficacia antioxidante (151). Las membranas donde se localizan los fosfolípidos son los sitios más sensibles a desarrollar la oxidación lipídica (43, 152).

Los alimentos emulsionados consisten en fases de lípido y agua donde una fase es dispersada en otra en forma de gotas estabilizadas por emulsionantes, impidiendo su agregación. Las emulsiones de aceite en agua consisten en gotas de aceite dispersas en un medio acuoso en presencia de un emulsionante que contiene componentes hidrofóbicos e hidrofílicos. En estas emulsiones, los antioxidantes lipofílicos son más eficaces que los hidrofílicos, pues se concentran en las interfases aceite/agua mientras que los hidrofílicos se encuentran disueltos a lo largo de la fase acuosa (29). La leche o la mayonesa son claros ejemplos de una emulsión de aceite en agua. Por otro lado están las emulsiones de agua en aceite, donde las gotas de agua se encuentran dispersas en un medio lipídico y estabilizadas por emulsionantes. La mantequilla y la margarina son un

ejemplo de estas emulsiones. En el caso de las emulsiones de agua en aceite, los antioxidantes hidrofílicos muestran mayor eficacia que los antioxidantes lipofílicos. Este comportamiento de los antioxidantes en las emulsiones es conocido como “paradoja polar”.

Los antioxidantes fenólicos que muestran mayor afinidad por las membranas de pescado son los que han mostrado mayor efectividad inhibiendo la oxidación en microsomas de pescado (153). La presencia de α -tocoferol aumenta el efecto positivo de los polifenoles, ya que puede ser regenerado por catequinas y otros compuestos fenólicos (154). El tocoferol se encuentra situado en las membranas a lo largo de la bicapa lipídica, donde los grupos hidroxilo se encuentran dispuestos hacia la interfase acuosa mientras que la cadena hidrocarbonada se sitúa hacia el interior de la estructura. (155).

8. ALIMENTACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO

Se puede definir el estrés oxidativo como el desequilibrio entre la superproducción de especies oxigenadas y los mecanismos de defensa antioxidante o reparadores en un tejido (156). Cuando un organismo se ve desbordado por un exceso de radicales libres, cualquier estructura biológica que lo forma puede convertirse en objetivo de estas especies reactivas y resultar dañada (157).

Aunque el consumo de PUFAs es muy recomendable debido a los efectos beneficiosos que se derivan de su ingesta, si éstos se encuentran alterados pueden representar un riesgo para la salud debido a un aumento de radicales libres, que provoca estrés oxidativo. Las especies reactivas que provocan la acción oxidante han sido asociadas con numerosas enfermedades crónicas y con el proceso de envejecimiento (158-160) como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7: Condiciones clínicas producidas por especies reactivas y radicales libres

TEJIDO/SISTEMA/ÓRGANO	PATOLOGÍA
Tracto gastrointestinal	Hepatitis, lesiones hepáticas
Ojos	Cataratas, daños en la retina
Piel	Dermatitis, pigmentos del envejecimiento
Sistema circulatorio	Aterosclerosis
Sistema nervioso	Ictus, Parkinson, Alzheimer
Sistema respiratorio	Asma, hiperoxia
Sistema endocrino	Diabetes, pancreatitis
Dientes	Periodontitis
Articulaciones	Artritis

Los hidroperóxidos lipídicos, así como determinados aldehídos, como el 4-hidroxi-2-nonenal y el malondialdehído (MDA) son compuestos que tienen un potencial efecto tóxico (161, 162). Existen evidencias que sugieren que los ROS asociados a la oxidación lipídica son los responsables de la correlación encontrada entre la ingesta de grasa y el cáncer colorrectal (163). La presencia de altas concentraciones de radicales libres puede causar lesiones en el ADN, pérdida de funcionalidad en las enzimas, cambios en la permeabilidad celular e incluso muerte celular por necrosis o apoptosis

(164). Estudios realizados con animales han mostrado un aumento en el desarrollo de la arteriosclerosis cuando son alimentados con lípidos oxidados (165). El consumo de lípidos oxidados también ha mostrado un aumento en la frecuencia de tumores desarrollados. El MDA, un producto secundario de la oxidación, es conocido por inducir mutagénesis en el ADN (161). Hay estudios realizados sobre ratas donde se muestra que el consumo de aceite de palma oxidado produce un incremento en los niveles de MDA en suero (166). Además, se han encontrado correlaciones positivas entre los niveles de MDA en suero y el índice de masa corporal, y entre el estrés oxidativo y la resistencia a la insulina (167). Todos estos estudios sugieren que la oxidación de los lípidos presentes en los alimentos podría tener una relación con el desarrollo de determinadas patologías. Los productos de oxidación de los PUFA's pueden formarse durante el almacenamiento del producto pesquero y también en el estómago (168) debido a la presencia de compuestos prooxidantes como la hemoglobina, que resulta más activa a pH ácido catalizando la oxidación lipídica (169).

La dieta humana contiene diferentes antioxidantes naturales que pueden contribuir al refuerzo de las defensas naturales del organismo que luchan contra el estrés oxidativo. Los efectos beneficiosos derivados del consumo de alimentos vegetales han sido atribuidos principalmente a las vitaminas antioxidantes, los carotenoides y, particularmente, a los compuestos fenólicos presentes en estos alimentos (170). Los compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, presentes en la dieta, se caracterizan por su actividad anticarcinógena, antiinflamatoria, antiaterogénica, antimicrobiana y antioxidante (171, 172). Los polifenoles han mostrado propiedades funcionales muy importantes previniendo las dolencias cardiovasculares. En 1819, el cardiólogo irlandés Samuel Black constató que los franceses tenían menores índices de mortandad debido a enfermedades cardiovasculares, comparado con ciudadanos irlandeses, atribuyendo estos resultados a “las costumbres francesas” y a su “estilo de vida”, que incluye el consumo de vino tinto. En 1991, los doctores Curt Ellison y Serge Renaud expusieron en un programa televisivo el hecho de que los franceses, consumiendo una dieta mucho más cargada en grasas animales, con un mayor consumo de tabaco y con niveles de colesterol semejantes o superiores que los norteamericanos, tenían una tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares muy inferior a la observada en Estados Unidos. Los doctores Renaud y Ellison defendieron la teoría de que la menor mortalidad de los ciudadanos franceses era debida a un consumo diario de entre 300 y 400 ml de vino. Ahí nació la *paradoja francesa*.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Durante la última década, en el grupo de investigación de Química de Productos Marinos se han llevado a cabo diversos estudios sobre la aplicación de antioxidantes naturales, procedentes de residuos agroforestales, en la inhibición de la oxidación lipídica del pescado y de los productos derivados de la pesca. La estructura (grado de polimerización y galoización), características físico-químicas (coeficiente de partición aceite-agua, capacidad reductora, antirradicalaria y quelatante), así como la interacción de dichos compuestos con el sistema antioxidante endógeno del músculo de pescado, han sido estudiadas en relación con su actividad antioxidante. Durante dichos años, se determinaron las características composicionales de los polifenoles de origen natural que proporcionan mejores resultados.

El objetivo de la presente tesis doctoral consistió en el estudio de los mecanismos que rigen la actividad de aquellos polifenoles de origen natural con mayor actividad antioxidante sobre el músculo de pescado. Asimismo, la investigación comprendió el efecto que dichos polifenoles pueden ejercer sobre la digestión y biodisponibilidad de los compuestos lipídicos del pescado, en particular los PUFA ω -3. Para ello se eligió un extracto de uva rico en procianidinas que en estudios anteriores mostró una alta capacidad para inhibir la rancidez en productos elaborados a base de músculo de pescado. El objetivo final es adquirir un conocimiento dirigido hacia el diseño apropiado de aditivos antioxidantes que incrementen la estabilidad y aumenten el valor funcional del producto de origen marino. Con la finalidad de alcanzar este objetivo global, se abordaron los siguientes objetivos parciales:

- El primer objetivo consistió en el estudio del efecto de los polifenoles naturales sobre la oxidación provocada por la hemoglobina, el prooxidante más importante presente en el músculo de pescado. Previamente se estudió la estabilidad y la actividad de diferentes hemoglobinas con el objetivo de determinar cuáles eran los mecanismos implicados en su acción prooxidante.
- El segundo objetivo consistió en el estudio de la afinidad de los polifenoles naturales por los fosfolípidos de membrana, y la relación con su actividad antioxidante. Se estudió la incorporación e interacción de los distintos compuestos naturales con sistemas modelo de membranas a través de distintas técnicas fluorescentes y sondas lipídicas.

- El tercer objetivo se enfocó en la posible modelización y predicción de la actividad de los polifenoles sobre el músculo de pescado. En primer lugar se estudió el efecto de la composición de un producto de la pesca sobre la susceptibilidad a desarrollar la oxidación lipídica. Posteriormente, se desarrolló un modelo que reproducía la oxidación lipídica y la acción de los antioxidantes mediante el uso de algoritmos que permitieron determinar las distintas pseudo-constantes de reacción.
- El último objetivo abordó el efecto de los polifenoles naturales, consumidos conjuntamente con el músculo, sobre la digestión y posterior absorción intestinal de los PUFA's del pescado. Se estudió la actividad de los polifenoles naturales para proteger los PUFA's de pescado de la oxidación que ocurre durante la digestión y el posible efecto en su absorción y metabolismo.

III. FUNDAMENTOS DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA

1. SISTEMAS MODELO UTILIZADOS PARA EVALUAR LA EXTENSIÓN DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA

Debido a la complejidad del proceso de la oxidación lipídica, así como del diferente comportamiento que pueden experimentar los antioxidantes en cada sistema lipídico, es frecuente el uso de sistemas modelo que reproduzcan, de una manera fiable, el comportamiento de los lípidos en sistemas reales. Los sistemas modelo más empleados para el estudio de factores que afectan a la rancidez en esta tesis doctoral han sido: los liposomas, el músculo de pescado lavado y el músculo de pescado picado.

- **Sistemas de membrana:** Los liposomas son sistemas modelo que imitan la estructura de la membrana celular. Están formados por fosfolípidos, que debido a su estructura anfifílica, forman vesículas con estructura de bicapa. Las membranas celulares son el sustrato donde se inicia la oxidación lipídica (43, 173). Los liposomas como sistema modelo para estudios de oxidación lipídica tienen la ventaja de que la misma molécula sirve tanto como sustrato oxidable y como emulsificador. Así no es necesario añadir un emulsificador y la influencia de éste en la oxidación lipídica queda anulada. El uso de liposomas como sustrato oxidable permite manipular de manera sencilla la composición lipídica, el pH, la temperatura, el contenido en antioxidantes y prooxidantes entre otros. Además, debido a su simplicidad y a su alta inestabilidad oxidativa, los liposomas pueden servir como sistemas modelo para realizar un “screening” de la capacidad antioxidante de los compuestos (174).
- **Alimentos basados en músculo:** En el mercado pueden encontrarse una gran cantidad de productos compuestos por músculo de pescado, así como de productos reestructurados. Los productos reestructurados están formados por recortes fileteados y por partes del músculo tradicionalmente poco comercializadas que, tras una manipulación tecnológica adecuada, permiten obtener productos pesqueros con unas determinadas características. En el pescado graso, la grasa se encuentra como gotas en el tejido muscular. En el músculo rojo, la grasa se encuentra en forma de gota en el interior de las células, mientras que en el músculo blanco, la grasa se encuentra dispersa fuera de las células. Debido a esta distribución tan heterogénea de la grasa en

los alimentos basados en músculo, para poder reproducir la evolución de la oxidación lipídica en estos productos es necesario la utilización de sistemas modelo que proporcionen una aproximación adecuada. El músculo lavado y el músculo picado son dos ejemplos de sistemas modelos utilizados. El lavado del músculo implica la eliminación de compuestos que influyen en la estabilidad oxidativa del pescado como prooxidantes y antioxidantes acuosos, pigmentos y grasa. Como resultado, se ha observado que la estabilidad del músculo puede aumentar (175) o disminuir (176). Estas contradicciones pueden ser atribuidas a la eliminación simultánea de prooxidantes y antioxidantes, así como en el aumento de la polaridad e insaturación de la fracción lipídica que permanece en el músculo (45).

2. COMPUESTOS FENÓLICOS PROCEDENTES DEL EXTRACTO DE SEMILLA DE UVA

El extracto de semilla de uva utilizado fue cedido por el departamento de ingeniería química de la Universidad de Santiago de Compostela, en el marco del proyecto AGL2006-12210-C03-01, y se obtuvo a partir del fraccionamiento de un extracto de semilla de uva comercial (Le Grandonnenque, Cruviers-Lascours, France). La metodología utilizada para la obtención de la fracción IV está recogida en el trabajo de Torres et al. (177).

El extracto comercial se incubó con una mezcla agua-etanol durante 24 horas con agitación para obtener el extracto crudo. El sólido obtenido se filtró 2 veces a través de lana de vidrio. El etanol se eliminó por evaporación y los restos de agua se eliminaron liofilizando el sólido. La grasa se extrajo con hexano y posteriormente los compuestos antioxidantes fueron extraídos de la fase acuosa con acetato de etilo. El acetato de etilo fue eliminado por evaporación a vacío y el residuo se resuspendió con agua y se filtró a través de un plato poroso. El agua se eliminó por filtración y posterior liofilización obteniendo el extracto total. Procedente de la fracción total se obtuvo la fracción I y II en función de su polaridad, mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (Pre-RP-HPLC). Los disolventes de la fracción I y II se eliminaron por evaporación a vacío y posterior liofilización. Los extractos fueron nuevamente fraccionados mediante cromatografía de exclusión por tamaños en una columna rellena de una resina de Toyopearl TSK HW-40F de 32-63µm de tamaño de partícula (Toso

Hass, Tokio, Japon). La separación se llevó a cabo en 2 etapas: una primera elución con MeOH permitió obtener fenoles de menor tamaño (fracción V procedente de la I, fracción III procedente del extracto total, y fracción VII procedente de la II), mientras que, una segunda elución utilizando agua:acetona (2:3) permitió obtener los polifenoles de mayor tamaño (fracción VI procedente de la I, fracción IV procedente del extracto total y fracción VIII procedente de la II).

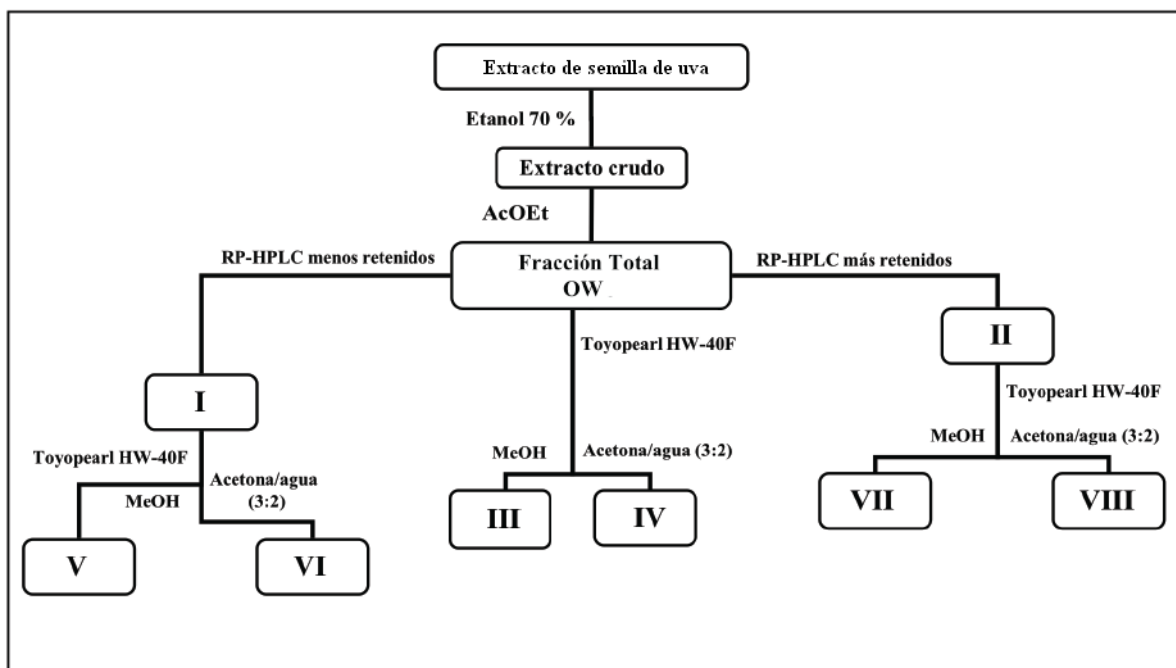


Figura 6: Esquema de extracción y fraccionamiento del extracto de semilla de uva

La fracción que ha sido utilizada en la presente tesis doctoral ha sido la IV, que presenta un grado de polimerización de 2.4 unidades, un grado de galoización del 15% y un peso molecular medio de 760g/mol y fue la que mejores propiedades antioxidantes mostró en músculo de pescado (178)

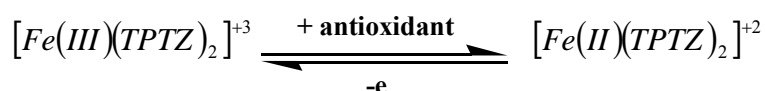
3. METODOLOGÍA PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

El creciente interés por el uso de antioxidantes naturales como aditivos alimentarios ha provocado que se desarrollen una gran cantidad de métodos para determinar la capacidad antioxidante. Los antioxidantes pueden ejercer su acción mediante mecanismos muy diversos. Por ello, no existe ningún procedimiento que permita evaluar la capacidad antioxidante por un solo método, por lo que es necesaria la

combinación de varios de ellos. En esta memoria, los métodos utilizados para evaluar la actividad antioxidante han sido:

3.1 Capacidad reductora

El FRAP (Ferric Reducting Antioxidant Power) es un método que cuantifica la capacidad reductora de un antioxidante basándose en su capacidad para reducir iones férricos. Se trata de una reacción donde se produce la transferencia de un electrón, provocando la reducción del complejo de la tripiridiltriazina férrica al complejo ferroso en medio ácido (179). Esta reacción produce un cambio de color que es monitorizado midiendo la absorbancia a 593 nm.



3.2 Capacidad antirradicalaria

La capacidad de un compuesto para atrapar radicales libres se puede evaluar a través del DPPH. Este método se basa en la neutralización del radical $DPPH^\bullet$, radical altamente estable y que posee una importante absorbancia a 515 nm (180), en presencia de un antioxidante. Los resultados se expresan a través de los parámetros cinéticos EC_{50} , cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la cantidad de radical, el t_{50} , que es el tiempo necesario que necesita esa concentración de antioxidante para reducir en un 50% la cantidad de radical, y la eficiencia radicalaria ($AE = 1/(EC_{50} \times t_{EC50})$), que tiene en cuenta los dos factores.

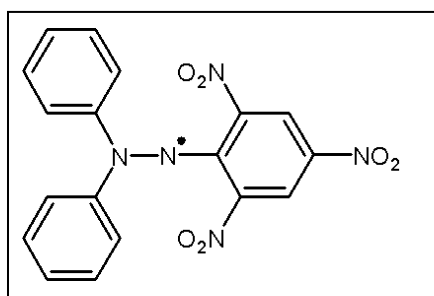


Figura 6: Radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

3.3 Capacidad quelatante

La capacidad quelatante de un antioxidante es la habilidad de éste para complejar cationes metálicos y así evitar la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos y la

producción de ROS. El procedimiento está basado en la capacidad de un antioxidante para quelatar hierro ferroso. El hierro ferroso libre puede formar un complejo con la ferrocina, que presenta un máximo de absorbancia a 560 nm (181). Si el antioxidante presenta capacidad quelatante se reduce la cantidad de Fe^{2+} libre, y por tanto la concentración del complejo ferrocina- Fe^{2+} , con el correspondiente descenso en la absorbancia a 560 nm.

La capacidad quelatante se expresa como proporción de hierro ferroso ligado al compuesto complejante, y se calcula con la siguiente ecuación:

$$\text{Capacidad quelatante (\%)} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$$

donde A_0 es la absorbancia del blanco correspondiente a la muestra sin compuesto quelatante, A_1 es la absorbancia de la muestra en presencia del compuesto quelatante y A_2 es la absorbancia del blanco formado por el compuesto quelatante y el hierro ferroso.

4. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA EXTENSIÓN DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA

La complejidad de la oxidación lipídica engloba una multitud de reacciones que producen importantes cambios físicos y químicos en las muestras. Se han empleado numerosos procedimientos para abordar la cuantificación de los procesos oxidativos, pudiéndose agrupar de la siguiente manera: métodos que miden el consumo de oxígeno, métodos que determinan o estudian los compuestos cuya concentración disminuye como consecuencia de la autooxidación, métodos que determinan una serie de componentes o grupos de componentes producidos en la misma, y el estudio de la estabilidad residual de los lípidos presentes.

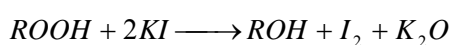
Los procedimientos encaminados a determinar la formación de compuestos que aparecen debido al proceso de oxidación lipídica pueden agruparse en función del tipo de compuesto formado:

1. Productos primarios de la oxidación de los lípidos o hidroperóxidos.
2. Productos secundarios de la oxidación; estas técnicas valoran el contenido en aldehído malónico, mezclas de aldehídos, carbonilos etc.

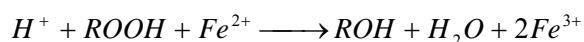
3. Compuestos formados como consecuencia de las interacciones entre los lípidos oxidados y otros componentes del pescado que contengan nitrógeno, como pueden ser los aminoácidos.

4.1 Valor de peróxidos

El valor de peróxidos es un método clásico usado para medir la extensión de la oxidación, que determina la formación de hidroperóxidos, productos iniciales de la oxidación lipídica. Se han descrito varias técnicas distintas, entre ellas la valoración yodométrica (182)



o la oxidación de los iones ferrosos a férricos (método del tiocianato) (183). El tiocianato férrico es el compuesto utilizado para medir el valor de peróxidos basado en la oxidación del hierro.



La determinación del valor de peróxidos es muy útil para aceites ya que pueden ser analizados directamente. Para alimentos, emulsiones o tejidos musculares, los lípidos deben ser extraídos cuidadosamente con mezclas de disolventes para evitar la descomposición de los hidroperóxidos.

4.2 Hidroperóxidos conjugados

Los dienos conjugados procedentes de los hidroperóxidos lipídicos poliinsaturados pueden ser determinados cuantitativamente de la disolución lipídica debido a su fuerte absorción a 234 nm (184). Una alícuota de muestra puede ser diluida directamente en metanol o hexano, y su absorbancia medida espectrofotométricamente.

4.3 Índice del ácido tiobarbitúrico

El índice del ácido tiobarbitúrico (TBA) se fundamenta en la detección del malondialdehído (MDA) y de otros aldehídos que se generan en la descomposición oxidativa de los PUFA's (185). Los aldehídos reaccionan con el ácido tiobarbitúrico

para formar una especie cromófora de color rosado que presenta un máximo de absorción a 532 nm.

5. SISTEMAS MODELO DE MEMBRANA

Las membranas en forma de bicapas cerradas o liposomas, preparadas a partir de moléculas anfifílicas dispersas en medio acuoso, están ampliamente reconocidas como modelos simples de membranas celulares. El estudio de los componentes lipídicos de las membranas biológicas en sistemas modelo simples permite la caracterización de dichos lípidos, así como la caracterización de su interacción con otros componentes presentes en la membrana. Los liposomas utilizados se clasifican según su tamaño y morfología (186):

- Vesículas unilamellares pequeñas (Small Unilamellar Vesicles o SUVs). Son vesículas consistentes en una única bicapa de lípidos, con un diámetro de entre 15-30 nm, y se preparan mediante sonicación, en baño o mediante una sonda.
- Vesículas unilamellares grandes (Large Unilamellar Vesicles o LUVs). Son vesículas de una sola bicapa, cuyo tamaño oscila en el rango de 50 y 500 nm. Pueden prepararse mediante extrusión en prensa francesa, a través de filtros de policarbonato, diálisis en detergentes, por fusión de SUVs o por fusión de SUVs inducida por Ca^{+2} .
- Vesículas multilamellares (Large Multilamellar Vesicles o MLVs). Son estructuras que consisten en bicapas concéntricas que se forman espontáneamente cuando se hidratan los lípidos anfifílicos. El diámetro medio de los MLVs es de unos 700 nm. Este tipo de liposomas posee la desventaja de que tan solo el 10-15% de los fosfolípidos se encuentran en la bicapa más externa, es decir, que solamente una pequeña fracción de lípidos puede interactuar con agentes externos.

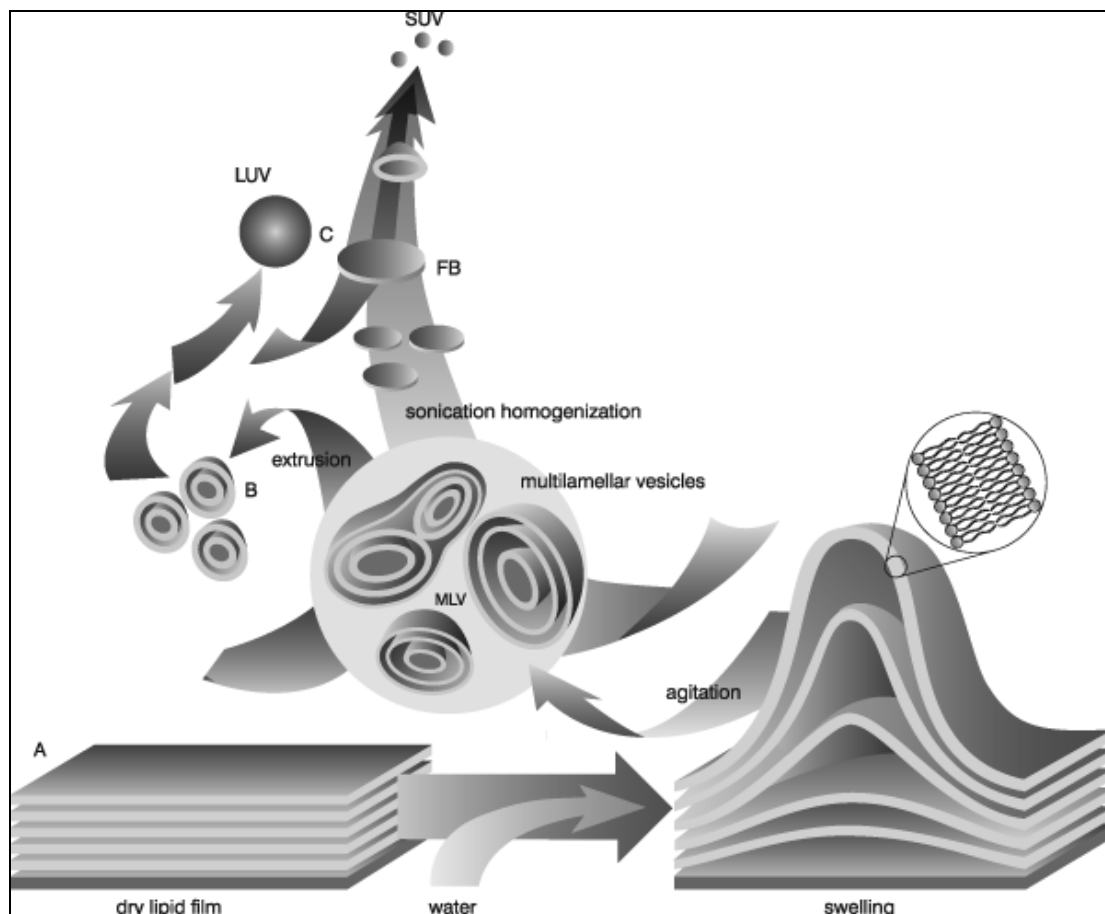


Figura 7: Representación esquemática de la preparación de diversos tipos de vesículas fosfolípicas

Los liposomas mejor caracterizados son los que están compuestos por una capa de lípidos, como son los LUVs y los SUVs. La mayor diferencia entre ambos, además de su tamaño, reside en la proporción de lípidos que hay en las hemicapas interna y externa. En los LUVs la distribución es casi simétrica, mientras que en los SUVs la hemicapa externa agrupa entre el 60 y el 70% del total de los lípidos, debido a su pequeño radio de curvatura.

6. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA ESTUDIAR LA INCORPORACIÓN E INTERACCIÓN DE COMPUESTOS EN MEMBRANAS MODELO

6.1 Fluorescencia

La fluorescencia es la propiedad de una sustancia para emitir luz cuando es expuesta a radiaciones electromagnéticas. El estudio de la fluorescencia proporciona una valiosa información, tanto cualitativa como cuantitativa, sobre aspectos estructurales de la molécula responsable, o de su relación con el medio que la rodea.

Cuando una molécula absorbe un fotón de la radiación que incide sobre ella, un electrón pasa desde un estado fundamental a un estado excitado. Una vez en el estado excitado, el electrón tiende a volver a su estado fundamental mediante varias vías (radiativas y no radiativas) que compiten entre sí. Los procesos de emisión fluorescente son procesos de relajación radiativos en los que el electrón “cae” desde el modo vibracional de menor energía a uno de los modos vibracionales del estado fundamental mediante la emisión de un fotón de luz. Para que una molécula pueda emitir fluorescencia es necesario que sea capaz de absorber luz, y por tanto poseer grupos cromóforos. Los cromóforos son enlaces o conjuntos de enlaces que pueden absorber la luz. De esta manera, las moléculas que por sus características químicas estructurales se desexcitan emitiendo fluorescencia, reciben el nombre de fluoróforos. Los fluoróforos se pueden dividir en intrínsecos y extrínsecos, según formen parte natural de la muestra o se añadan artificialmente para conferir las propiedades fluorescentes deseadas.

Las membranas lipídicas no presentan fluorescencia natural, por lo que para el estudio de las propiedades de la bicapa es necesario utilizar sondas fluorescentes que se inserten en ellas. La elección del fluoróforo para el estudio con biomembranas no debe ser al azar, sino que dependerá de la zona de la membrana y la propiedad de ésta que se pretende estudiar.

La información que puede obtenerse de la emisión de fluorescencia de una molécula es muy variada. Según la ley de Stokes, el fotón emitido por fluorescencia tiene siempre menor energía que el fotón absorbido, dando lugar a que la frecuencia de la luz emitida por los fluoróforos sea siempre menor que la de la radiación incidente. En el caso de fluoróforos polares, este desplazamiento va a ser mucho mayor en presencia de un disolvente polar, debido a interacciones entre el fluoróforo excitado y el entorno. Esta propiedad proporciona información acerca del microambiente en el que se encuentran situados los fluoróforos. El cambio de intensidad de la radiación emitida también puede dar información acerca del entorno en el cual se encuentra un fluoróforo. De hecho, esta propiedad puede ser utilizada para el cálculo del coeficiente de partición (K_p) de una molécula fluorescente entre la fase lipídica y la fase acuosa (187).

6.1.1 Quenching de la fluorescencia

La atenuación de la fluorescencia (quenching) es otro parámetro de utilidad a la hora de caracterizar un sistema estudiado. El proceso consiste en la desexcitación de la molécula a través de un proceso no radiativo provocada por una molécula ajena al

fluoróforo, que recibe el nombre de atenuador o quencher. Los principales mecanismos de acción del atenuador son la atenuación colisional o dinámica y atenuación estática. La atenuación colisional o dinámica es aquella en la que el atenuador devuelve al fluoróforo, en un estado excitado, a su estado fundamental mediante un proceso no radiativo. En la atenuación estática, el atenuador se asocia a un fluoróforo, formando un complejo en equilibrio con las especies separadas, que permanece en estado de mínima energía. Cuando se excita un fluoróforo libre, la emisión de fluorescencia se lleva a cabo por el mecanismo previamente descrito, mientras que si se encuentra asociado a un atenuador, el fluoróforo en estado excitado pasa a un estado fundamental sin emitir radiación. Por consiguiente, la atenuación dependerá de la concentración del atenuador que exista en el medio, tanto en atenuación estática como en atenuación dinámica.

Una de las aplicaciones bioquímicas de esta técnica es la localización de moléculas en membranas a través de atenuadores selectivos. Estos atenuadores presentan diferentes preferencias por distintos entornos. La acrilamida, por ejemplo, es un atenuador hidrofílico que disminuye la fluorescencia de grupos fluoróforos localizados en fase acuosa o la interfase lípido/agua y no inmersas en las bicapas fosfolipídicas. Las sondas 5NS y 16NS son ejemplos de atenuadores hidrofóbicos. Estas moléculas son derivados del ácido esteárico derivatizadas con grupos doxiles (atenuadores) en la cadena hidrocarbonada, concretamente en los carbonos 5 (5NS) y 16 (16NS). Estas moléculas se utilizan para localizar fluoróforos a diferentes profundidades dentro de la membrana (quenching selectivo). El 5NS es un atenuador eficaz para moléculas que se encuentran cerca de la interfase de la membrana, mientras que el 16NS atenúa mejor las moléculas que se sitúa en la profundidad de la membrana (188).

6.1.2 Anisotropía de fluorescencia

Otra característica de los fluoróforos es que pueden ser excitados fotoselectivamente. Las moléculas fluorescentes absorben los fotones cuyo vector eléctrico es paralelo al momento de transición de su dipolo. Si se excita una población de fluoróforos con luz polarizada, se excitará selectivamente a aquellos fluoróforos que estén orientados con su momento de transición paralelo al vector eléctrico de la excitación. Del mismo modo, la emisión tendrá lugar en forma de luz polarizada a lo largo de un eje fijo en el fluoróforo. La velocidad con la que un fluoróforo es capaz de rotar durante su tiempo de vida media en el estado excitado determinará su polarización o anisotropía. Esta característica puede ser directamente relacionada con la fluidez de las bicapas lipídicas.

Un grupo de sondas comúnmente utilizadas para estimar la fluidez y el grado de orden de la empalizada lipídica a diferentes alturas son el DPH (1,6-difenil-1,3,5 hexatrieno), el PA-DPH (ácido 3-(4-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil) propiónico), y el TMA-DPH (1-(4-trimetilamonio)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno). El DPH presenta ciertas características que permite su localización en la profundidad de la membrana lipídica:

- Se trata de una molécula altamente hidrofóbica, por lo que tiende a situarse en ambientes altamente apolares.
- Su estructura en forma de varilla permite que el DPH se empaquete bien entre las cadenas acílicas de los fosfolípidos (189).

Su derivado catiónico, el TMA-DPH, localiza su grupo fluoróforo en la zona de las cabezas polares, proporcionando así información del orden estructural de la interfase fosfolipídica. El PA-DPH, otro derivado sin carga, se localiza en el interior de las membranas pero a una profundidad distinta que el DPH (190).

6.1.3 Polarización generalizada de Laurdan

La sonda 2-dimetilamino-6-lauroilnaftaleno (Laurdan) es un compuesto que se inserta en la bicapa lipídica mediante una cadena de ácido láurico, y donde su residuo fluorescente naftaleno queda localizado a nivel del esqueleto del glicerol de los fosfolípidos (191). Las propiedades del Laurdan residen en su sensibilidad a la polaridad, y a la dinámica molecular de los lípidos presentes en su entorno, debido a los procesos de relajación de dichos dipolos (191). La emisión del Laurdan depende fuertemente del empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas.

La rotación de las moléculas de agua es muy lenta cuando la membrana se encuentra en fase gel. Sin embargo, cuando los fosfolípidos de membrana se encuentran en fase de líquido-cristalino la rotación es más rápida y los procesos de relajación ocurren rápidamente, desplazando el espectro de emisión de la sonda Laurdan hacia el rojo (191). Estos cambios espectrales pueden cuantificarse a través del parámetro “Polarización Generalizada” de la fluorescencia en estado estacionario.

6.2 Efecto Tyndall

El efecto Tyndall es un fenómeno por el cual una partícula coloidal es capaz de dispersar la luz, convirtiéndose en un emisor de luz de menor intensidad. La dispersión de la luz producida por un coloide es directamente proporcional a su tamaño (192).

El Tritón X-100 es uno de los detergentes no-iónicos más frecuentemente usados, cuando se mezcla con vesículas lipídicas se forman agregados Tritón-lípido. En presencia de un exceso de Tritón X-100, esos agregados toman forma de micela compuesta por una mezcla de lípido-detergente (193, 194). Estas micelas son mucho más pequeñas que las vesículas y por tanto la incorporación del detergente primero a las vesículas, y después a las micelas de lípido-detergente, es considerada solubilización. Sin embargo, la mezcla de lípido y detergente no siempre lleva a la solubilización. Una bicapa compuesta por detergente y lípido se forma cuando la relación lípido detergente es baja (195).



Ilustración 1: Pérdida de densidad óptica producida por la niebla a través del efecto Tyndall.

El grado de solubilización de las membranas por el Tritón X-100 es frecuentemente usado para evaluar la formación de dominios de membrana. Debido a que las micelas son mucho más pequeñas que las vesículas, las micelas son capaces de dispersar mucha menos luz que las vesículas. De este modo, a través de la medida de la densidad óptica podemos determinar el grado de solubilización de las vesículas.

6.3 Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC del ingles Differential Scanning Calorimetry) es una técnica termoanalítica que mide la cantidad de calor absorbida o emitida por una muestra en función de la temperatura, frente a una muestra de referencia, debido a cambios físicos y/o químicos en la muestra.

El estado físico de los lípidos está íntimamente relacionado con la temperatura, de manera que pueden experimentar diversos cambios de fase a través del calentamiento. La calorimetría diferencial de barrido proporciona información muy útil en el estudio de lípidos en membranas modelo y biológicas, ya que al no incorporar sondas no se producen perturbaciones en las membranas. Cuando una suspensión de vesículas fosfolípicas es calentada los fosfolípidos que la componen sufren una transformación endotérmica altamente cooperativa que produce un cambio en su estado físico, pasando de un estado rígido altamente ordenado (gel) a otro estado más fluido y desordenado (líquido-cristalino) (196). La presencia de otras moléculas intercaladas en la empaquetada lipídica puede disminuir la cooperatividad de los fosfolípidos en un cambio de fase.

7. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA ESTUDIAR LA ABSORCIÓN DE NUTRIENTES

7.1 Modelo de tracto gastrointestinal (TIM-1)

El TIM-1 es un equipo que reproduce el tracto digestivo, proporcionando una visión rápida de la solubilidad, liberación y biodisponibilidad para la absorción de fármacos y nutrientes en el tracto intestinal. Es un sistema preciso y con mucho más valor predictivo que experimentos realizados bajo las condiciones de cada órgano, siendo además una alternativa económica a ensayos con humanos y animales. El sistema está controlado por un ordenador que regula las condiciones del tracto gastrointestinal. Además, los compartimentos por los que está formado, que simulan los distintos órganos del sistema digestivo, están interconectados por válvulas que reproducen la temperatura corporal y los movimientos peristálticos. La acidez y la concentración de electrolitos en el sistema son reguladas, así como la secreción de saliva, enzimas, ácido gástrico, jugo pancreático y sales biliares.

Las principales ventajas de este equipo son el ahorro de tiempo y dinero en el ensayo de la solubilidad, estabilidad, perfiles de liberación, disponibilidad o absorción de fármacos y nutrientes, incluso de la interacción entre ambos.



Ilustración 2: Sistema modelo del tracto gastrointestinal TIM-1

7.2 Modelos intestinales: Línea celular Caco-2

Las células epiteliales del intestino constituyen el principal lugar de absorción de nutrientes en el cuerpo humano. Para reproducir satisfactoriamente una barrera biológica como la mucosa intestinal con un cultivo celular *in vitro*, la selección y las propiedades de la línea celular modelo son de gran importancia (197). Esto es debido a que el transporte y las propiedades metabólicas de las células pueden variar dependiendo de la densidad con la que fueron sembradas, si las células han llegado a confluencia, el episodio de diferenciación celular en el que se encuentran, la presencia o ausencia de nutrientes esenciales y/o factores de crecimiento (197).

La línea celular Caco-2 fue establecida en 1974 y procede de un adenocarcinoma de colon humano (198). Esta línea celular es usada como monocapa y no como células aisladas. Durante su fase de crecimiento exponencial las células permanecen indiferenciadas, y la diferenciación solo ocurre tras alcanzar la confluencia celular, durante su fase estacionaria, adoptando una morfología y funcionalidad de tipo enterocitario (197). Las células diferenciadas forman una monocapa de células polarizadas, que presentan microvellosidades en su parte apical, fenotipo y funcionalidad que se asemeja a los enterocitos que recubren el intestino delgado (199). Además, las células Caco-2 expresan proteínas que median en la absorción de ácidos grasos (200, 201). Debido a la gran cantidad de propiedades morfológicas y funcionales que presentan las monocapas de células Caco-2 con el epitelio intestinal *in vivo*, ésta puede ser utilizada para una rápida evaluación de la absorción, transporte y metabolismo de nutrientes y fármacos, a pesar de su origen cólico (202).

IV. RESULTADOS

CAPÍTULO 1

**DETERMINACIÓN DE LOS MECANISMOS
IMPLICADOS EN LA ACTIVIDAD PROOXIDANTE DE
LA HEMOGLOBINA EN SISTEMAS LIPÍDICOS, ASÍ
COMO SU INHIBICIÓN MEDIANTE ANTIOXIDANTES
CON CAPACIDAD QUELATANTE Y DONADORA DE
ELECTRONES.**

1. DETERMINACIÓN DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA ACTIVIDAD PROOXIDANTE DE LA HEMOGLOBINA EN SISTEMAS LIPÍDICOS, ASI COMO SU INHIBICIÓN MEDIANTE ANTIOXIDANTES CON CAPACIDAD QUELATANTE Y DONADORA DE ELECTRONES.

1.1 Introducción

Como se ha indicado anteriormente, está ampliamente demostrado que las hemoproteínas son uno de los compuestos endógenos más prooxidantes presentes en el músculo de pescado (29). Diferentes hemoglobinas de pescado han mostrado activar la oxidación en sistemas lipídicos como microsomas (203) y sistemas de músculo lavado de pescado (58, 77). La Hb es la hemoproteína mayoritaria en el músculo blanco de pescado, mientras que en el músculo rojo coexiste con la mioglobina (81). Richards y Hultin (81) observaron que la Hb se encuentra en una concentración suficiente como para iniciar la oxidación lipídica en el músculo blanco de caballa. Otras especies como el atún, el jurel o la sardina también presentan elevadas concentraciones de Hb en su músculo, capaces de catalizar la aparición de compuestos volátiles asociados a la rancidez (41, 77, 81). Además, se ha demostrado que la Hb tiene actividad catalítica para desarrollar la oxidación, incluso a bajas concentraciones de lípidos presentes en el músculo de pescado (40).

Son numerosas las reacciones implicadas en la degradación de la Hb que justifican su carácter prooxidante. La formación de metaHb y de especies perferriilo, la liberación del grupo hemo o la liberación del hierro del grupo hemo son las reacciones fundamentales asociadas a la actividad prooxidante de esta proteína. Todos estos procesos pueden agruparse en dos mecanismos, el primero transcurre a través de la formación de radicales lipídicos a través de la descomposición de los hidroperóxidos (52, 55) mientras que el segundo se basa en la capacidad de la perferrihemoglobina para iniciar la oxidación lipídica al actuar directamente sobre los lípidos. La diferente secuencia de aminoácidos en las hemoglobinas de distintas especies determina sus estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias, y provoca que sus velocidades de degradación sean diferentes y por tanto, también sus capacidades prooxidantes. Las hemoglobinas de pescado han demostrado ser más prooxidantes que aquellas procedentes de animales terrestres como ternera, pollo o pavo (58). Varios trabajos han estudiado como influyen de forma individual o aislada los procesos de degradación de estas proteínas, como la autooxidación (204) o la pérdida de grupo hemo (205). Sin

embargo, todavía no se ha determinado como influyen estos procesos, ni la presencia de productos de degradación de la oxidación lipídica, en la actividad prooxidante global de la Hb.

Por otro lado, se han utilizado diversos procedimientos para aumentar la estabilidad oxidativa del pescado y productos derivados de la pesca. El desangrado (206) y el lavado (207) son dos ejemplos que han resultado eficaces. La adición de antioxidantes naturales es otro procedimiento que también ha mostrado eficacia inhibiendo la actividad prooxidante de la Hb (153, 208). Lee et al (209) observaron una inhibición de la oxidación lipídica catalizada por la Hb mediante la adición de polifenoles naturales procedentes de arándanos. Hu et al (210) mostraron que un polifenol como el EGCG es eficaz reduciendo la especie hipervalente ferrilmioglobina, capaz de iniciar la oxidación lipídica. Pazos et al (153) observaron una significativa inhibición, por parte de fenoles naturales, en la oxidación promovida por la Hb en microsomas, atribuyendo el principal efecto antioxidante a su incorporación en membranas lipídicas (ricas en ácidos grasos poliinsaturados) y en menor medida a su actividad quelatante y donadora de electrones. Por tanto, los distintos estudios muestran que los polifenoles naturales pueden retardar la aparición de atributos organolépticos asociados a la rancidez oxidativa. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales los distintos compuestos fenólicos pueden ejercer su efecto antioxidante sobre las actividades prooxidantes endógenas del músculo de pescado no se encuentran suficientemente esclarecidos.

En este primer capítulo de la tesis se profundizó en los mecanismos que rigen la actividad prooxidante de la Hb. Asimismo, para esclarecer los mecanismos de actuación de los polifenoles sobre los agentes prooxidantes endógenos del músculo de pescado, se estudió la inhibición de la oxidación lipídica promovida por la Hb en el músculo de pescado a través de la incorporación de aditivos de diversos compuestos con propiedades antioxidantes diferentes.

En una primera parte se caracterizaron las hemoglobinas procedentes de tres especies pesqueras de una gran importancia comercial en Galicia, como son el abadejo (*Pollachius pollachius*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y el jurel (*Trachurus trachurus*). Los experimentos se llevaron a cabo, con las distintas Hbs aisladas o en presencia de productos de degradación de la oxidación lipídica, en condiciones *in vitro*. Se determinó la oxigenación inicial, velocidad de autooxidación y liberación del grupo hemo, así como la influencia de los productos de degradación de la oxidación lipídica en dichos parámetros. Se evaluó la presencia de distintas isoformas dentro de la Hb de

cada especie. La capacidad prooxidante de las distintas Hbs, así como de sus productos de degradación, también fue evaluada. En una segunda parte se estudiaron distintos procedimientos para inhibir la oxidación catalizada por la Hb. Para ello se estudió el efecto antioxidante de compuestos con capacidad reductora, quelatante de hierro o ambas. La actividad prooxidante de la Hb y antioxidante de los distintos aditivos estudiados se investigó en sistemas liposomiales y en músculo de pescado lavado. Ambos sistemas se caracterizan por presentar una elevada proporción de fosfolípidos, que son posiblemente los primeros sustratos de la oxidación (43), y por contener una reducida cantidad de prooxidantes y antioxidantes hidrofílicos (211), factores que permiten la adición de la Hb y los distintos antioxidantes de manera controlada. Además se estudió la autooxidación de la Hb en presencia del extracto de polifenoles planteado.

1.2 PUBLICACIÓN

Involvement of Methemoglobin (MetHb) Formation and Hemin Loss in the Prooxidant Activity of Fish Hemoglobins

Rodrigo Maestre, Manuel Pazos, and Isabel Medina

J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 7013–7021

Involvement of Methemoglobin (MetHb) Formation and Hemin Loss in the Pro-oxidant Activity of Fish Hemoglobins

RODRIGO MAESTRE, MANUEL PAZOS,* AND ISABEL MEDINA

Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Eduardo Cabello 6, E-36208 Vigo, Spain

The capacity of Atlantic pollock (*Pollachius pollachius*), seabass (*Dicentrarchus labrax*), and horse mackerel (*Trachurus trachurus*) hemoglobin (Hb) to promote lipid oxidation has been evaluated in liposomes and washed minced horse mackerel muscle. The pro-oxidant ability of fish Hbs was related with their vulnerability to suffer oxidation to metHb and release hemin either in spontaneous situation or in the presence of two representative lipid oxidation products, linolein hydroperoxides and *trans*-2-pentenal. The results indicated similar effectiveness to promote lipid oxidation in liposomes and washed fish muscle: pollock Hb > horse mackerel Hb > seabass Hb. Pollock Hb showed a more elevated autooxidation rate and spontaneous hemin loss and also faster oxidation to metHb in the presence of hydroperoxides and *trans*-2-pentenal. The autooxidation and spontaneous hemin loss rates were intermediate for horse mackerel Hb, whereas seabass Hb exhibited the highest stability. The isoelectrofocusing (IEF) pattern of pollock Hb revealed the presence of isoforms with elevated anionic character, which are known to have poor oxygen affinity at the pH values found in fish muscle (pH 7.0–5.5). In agreement with the IEF patterns, pollock Hb was less oxygenated at pH 6.8, and seabass Hb exhibited more oxygenation than did horse mackerel. MetHb forms were significantly more effective in catalyzing lipid oxidation than the corresponding reduced fish Hbs and free hemin. The present investigation highlights a direct correlation between the pro-oxidant capacity of fish Hbs and their susceptibility to undergo metHb formation and hemin loss and also suggests a potential role of lipid oxidation byproducts in activating the pro-oxidative action of hemoglobin.

KEYWORDS: Fish hemoglobin; pro-oxidant; autooxidation; methemoglobin; hemin loss; hydroperoxides; *trans*-2-pentenal; isoelectrofocusing

INTRODUCTION

Lipid oxidation is a major cause of quality deterioration in muscle-based foods where flavor, color, texture, and nutritional value can be drastically affected (1). Fish muscle is especially susceptible to develop damaging oxidative processes as a consequence of a lipid composition rich in long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA), essentially eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 ω -3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 ω -3). The vulnerability of the allylic and bisallylic C–H bonds of PUFA to form carbon-centered free radicals is essentially involved in either initiation or propagation chain reactions of lipid oxidation (1, 2). Among the catalysts of lipid oxidation, heme pigments such as hemoglobin and myoglobin are considered to play a fundamental role in the oxidative deterioration of fish muscle. Several investigations have expressed that fish hemoglobins catalyze lipid oxidation more intensively than those from terrestrial animals such as beef, chicken, and turkey (3, 4) and that catalytic amounts of fish hemoglobin are able to initiate extensively lipid oxidation in a model system of washed minced fish muscle (5, 6).

Hemoglobin has been reported to be the prevalent heme pigment in mackerel light muscle (6 μ mol of Hb/kg) and whole rainbow trout muscle (11 μ mol of Hb/kg), whereas dark muscle from mackerel contained roughly equal amounts of hemoglobin (Hb) and myoglobin (Mb) on a weight basis (5). Hemoglobin is composed of four polypeptide chains with each chain containing one heme group, whereas myoglobin is a monomeric molecule with a single polypeptide chain holding a heme group. The prosthetic heme moiety consists of an iron atom coordinated in the center to a porphyrin ring. Two main pathways are considered to explain the pro-oxidative capacity of Hb/Mb. One includes the ability of heme proteins to stimulate the generation of free radicals via cleavage of preformed lipid hydroperoxides. O'Brien (7) has shown that oxyHb cleaves hydroperoxides significantly more rapidly than free ferrous iron and free ferric iron. Accordingly, we have reported faster kinetics of hydroperoxide decomposition in fish membranes triggered by horse mackerel Hb than in those activated by ferrous iron (8). In addition, free hemin, which designates to the ferric porphyrin ring, has demonstrated higher aptitude to generate free radicals through decomposition of preformed hydroperoxides in conditions of low hydroperoxide concentration, whereas either reduced or oxidized forms from rainbow trout Hb were more effective

*Author to whom correspondence should be addressed (e-mail mpazos@iim.csic.es; telephone +34 986 231930; fax +34 986 292762).

under more elevated hydroperoxide concentration or successive episodes to hydroperoxide exposure (9). These results draw attention to a central role of the free heme and the affinity of hemoglobin by heme during the initial stages of lipid oxidation. The formation of the hypervalent ferryl Hb radical [$\text{HbFe}(\text{IV})=\text{O}$], which can initiate lipid peroxidation via abstraction of a hydrogen atom of a PUFA, is also proposed as a principal pathway for the pro-oxidative activity of Hb/Mb (10). Ferryl Hb radical species are generated by reaction of metHb with hydrogen peroxide or preformed lipid hydroperoxides. Consequently, the propensity of Hb to be oxidized to metHb appears to necessarily influence the contribution of this preceding mechanism to hemoglobin-catalyzed lipid oxidation. However, more research is needed to understand completely the real contribution of all these mechanisms on the pro-oxidative activity of Hb.

The purpose of the present study was to characterize the pro-oxidative activity of hemoglobins from three commercial fish species (Atlantic pollock, horse mackerel, and seabass) and to estimate the most decisive factors involved in such activity. For such scope, the activity of fish hemoglobins to promote lipid oxidation was studied in liposomes and washed minced fish muscle, which can essentially mimic membranes and fish muscle. The pro-oxidant activity was then related with the oxygenation state of such hemoglobins and their vulnerability to undergo metHb formation and heme loss. The pro-oxidative capacity of fish Hb (mainly found in reduced form) was compared with that found for free heme (oxidized form of heme) and the corresponding metHb species. Furthermore, the diverse isoforms of fish hemoglobins were characterized by native isoelectrofocusing (IEF) electrophoresis.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Atlantic pollock (*Pollachius pollachius*), seabass (*Dicentrarchus labrax*), and horse mackerel (*Trachurus trachurus*) were acquired from a local market. Bovine hemoglobin, heme chloride, ammonium persulfate, sodium heparin, tris[hydroxymethyl]aminomethane (Tris), sodium dithionite, dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), lecithin from soybean with 30% of 1- α -phosphatidylcholine, thiobarbituric acid, trichloroacetic acid, 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP), $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, streptomycin sulfate, butylated hydroxytoluene (BHT), *trans*-2-pentenal, and 5-sulfosalicylic acid were purchased from Sigma (Steinheim, Germany). Carbon monoxide (99.97%) was provided by Air Liquide (Porriño, Spain). Linolein hydroperoxides (>98%) were purchased from Cayman Europe (Tallin, Estonia). IEF polyacrylamide gels were obtained from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). All chemicals and solvents used were of either analytical or HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany).

Extraction of Fish Hemoglobin. Blood was taken from the caudal vein after cutting off the tail of individual fresh fish in the rigor state. Blood was collected with a transfer glass pipet rinsed with 150 mM NaCl and sodium heparin solution (30 units/mL), and it was immediately mixed with approximately 1 volume of the saline sodium heparin solution. Hemolysate was then prepared according to the method of Richards and Hultin (11). The visible spectrum at pH 8.6 showed that fish Hb was mostly reduced and oxygenated because of the appearance of two absorption peaks at 540 and 570 nm, which are characteristic of fully oxygenated Hb (OxyHb). Hemolysate was stored at -80°C for no longer than 2 weeks and thawed just before used.

Preparation of Methemoglobin (MetHb). MetHb was obtained by oxidation of the corresponding fish Hb by modification of the procedure of Svistunenko et al. (12). Briefly, Hb was incubated with 4 mM ammonium persulfate for 1 h at room temperature, and then passed through a PD-10 desalting column containing 8.3 mL of Shephadex G-25 medium (GE Healthcare). Following recommendations of the manufacturer, 1 mL of metHb solution was loaded on the column and then eluted with 3.5 mL of a 1 mM Tris solution, pH 8. MetHb was stored at -80°C and thawed just before used.

Determination of the Total Hemoglobin Concentration. Hemoglobin was quantified in the hemolysate and in the metHb solutions according to the method of Brown (13). Briefly, samples diluted to 0.2–1.2 μM Hb in 50 mM Tris, pH 8.6, were mixed with around 1 mg of sodium dithionite and bubbled with carbon monoxide gas for 20 s. The samples were then scanned from 400 to 480 nm against a blank that contained only Tris buffer. The peak absorbance was recorded, and the absorbance at the peak (≈ 416 nm) minus the absorbance at the valley (465 nm) was related with the hemoglobin concentration. A standard curve was built with commercial hemoglobin from bovine blood.

Determination of the Relative Oxygenation of Fish Hb. Fish Hb was diluted in a 50 mM phosphate buffer at pH 6.8 to a concentration of 5 μM , and then the visible spectrum ranging from 500 to 640 nm was acquired. Two well-defined peaks faintly overlapped are characteristic in this area of the spectrum for oxyHb (14), and the difference in absorbance between the peak (574 nm) and the valley (560 nm) was used to estimate their initial relative state of oxygenation as previously employed by Richards and Hultin (11).

Hb Autoxidation and MetHb Formation in the Presence of Lipid Oxidation Byproducts. The experiments were performed by incubating 5 μM fish Hb in 50 mM phosphate buffer (pH 6.8) at 4°C in the absence (autoxidation) or presence of primary and secondary lipid oxidation products, linolein hydroperoxides and *trans*-2-pentenal, respectively. Linolein hydroperoxides were added in ethanolic solution on an empty cuvette and dried under a flow of nitrogen gas before the incorporation of Hb solution in phosphate buffer. *trans*-2-Pentenal was directly incorporated in aqueous solution. The final concentrations of linolein hydroperoxides and *trans*-2-pentenal were 125 and 1000 μM , respectively. The formation of metHb was evaluated at different incubation times by adaptation of Winterbourn's equation (14) that estimates the concentration of metHb in micromolar (on hemoglobin basis) considering the absorbance at 576 and 630 nm:

$$[\text{MetHb}] = \left(\frac{279A_{630} - 3A_{576}}{4} \right)$$

Determination of Heme Loss from Fish Hb. The method has been developed in our laboratory and is derived from the differential polarities of hemoglobin (polar) and free heme (apolar) and the capacity of solid phase extraction (SPE) by C18 cartridges to retain compounds with low polarity. ISOLUTE C18 100 mg/1 mL cartridges (Biotage, Uppsala, Sweden) were previously preconditioned with 2 mL of a water/methanol (1:1) solution, and then 1 mL of a 5 μM Hb solution was passed through. Later, cartridges were washed with 4 mL of water and dried for 15 min by passing through a flow of air by action of a vacuum pump. Free heme was eluted with 1 mL of methanol, and the absorbance peak of heme in the visible spectrum (350–450 nm) was acquired. The standard curves were built up with known concentrations of commercial heme chloride subjected to the entire procedure, providing good linearity ($R^2 > 0.99$) in the range of heme concentration of 1–12 μM . The method showed good repeatability with variation coefficients ranging from 2 to 6%.

Experiments in Liposomes. Liposomes were daily prepared according to the procedure described by Huang and Frankel (15). Briefly, lecithin at a concentration of 0.8% (w/w) was dissolved in 50 mM phosphate buffer at pH 6.8 by magnetic stirring and subsequently sonicated for 10 min with a water bath ultrasonicator (P-Selecta, Barcelona, Spain). Liposomes were then filtered through a paper filter and introduced into 50 mL Erlenmeyer flasks. Liposomes with Tris buffer or Hb were incubated at 30°C in a thermostatic water bath (P-Selecta), and the oxidative stability of liposomes was evaluated by monitoring conjugated dienes and TBARS at different incubation times. Fish Hb and heme were incorporated at 3 μM on a hemoglobin basis.

Experiments in Washed Minced Fish Muscle. Washed minced muscle was prepared from light muscle of horse mackerel by modification of the procedure previously described by Richards and Hultin (5). Briefly, fish mince was washed twice in distilled water at a 1:3 mince-to-water ratio (w/w) by stirring with a plastic rod for 2 min. The mixture was allowed to stand for 15 min and then dewatered on a stainless strainer. Washed minced muscle was finally mixed with a 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, and streptomycin sulfate (200 ppm) was added to inhibit microbial growth. Washed fish muscle was supplemented with Hb or heme in at

3 $\mu\text{mol/kg}$ of muscle (on Hb basis), whereas the corresponding volume of 1 mM Tris buffer, pH 8.0, was added in control samples. The final moisture of the washed fish muscle was $84.2 \pm 0.8\%$. The samples were incubated at 4 °C, and peroxide value and TBARS were measured every day during the storage period.

Conjugated Dienes. Liposomes (100 mg) were dissolved in 3 mL of methanol, and the absorbance was measured at 234 nm (UV-vis spectrophotometer Perkin-Elmer) and calculated as millimoles of dienes per kilogram of phosphatidylcholine (PC) as previously described by Frankel and co-workers (16).

Peroxide Value (PV). PV was measured in washed minced fish muscle using the procedure by Buege and Aust (17), which is based on a lipid extraction with 5 mL of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (2:1) and analysis by using the ferric thiocyanate method (18). PV was expressed in milliequivalents (mequiv) of oxygen per kilogram of lipid.

Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Analyses. TBARS were determined in liposomes and washed minced fish muscle according to the method of McDonald and Hultin (19). 1,1,3,3-Tetraethoxypropane was used as standard. The results are expressed in terms of milligrams of malonaldehyde (MDA) per kilogram of phosphatidylcholine (PC) or muscle in liposomes and washed fish muscle, respectively.

Native IEF Pattern of Fish Hb. Native IEF was done using precast polyacrylamide gels (Ampholine PAGplate IEF, $250 \times 110 \times 1$ mm, pH 3.5–9.5, GE Healthcare). Sixty micrograms of total proteins was applied near a cathode using pieces of sample application paper (GE Healthcare). One line with markers of isoelectric point (pI) in the range of pH 3.5–9.5 (Broad pI calibration Kit, GE Healthcare) was included. The IEF gels were run at 10 °C in a Multiphor II electrophoresis unit (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) with a thermostatic water-circulator unit. The running conditions were as follows: 30 W constant (1500 V maximum) for 1.5 h, with 15 min prefocusing. Gels were maintained for 30 min in fixed solution [sulfosalicylic acid 5% (w/v) and trichloroacetic acid 10% (w/v)] and then stained with Coomassie brilliant blue R250 (GE Healthcare).

Statistical Analysis. The experiments were performed twice, and data are reported as mean \pm standard deviation of three replicates ($n = 3$). The data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and the least-squares difference method. Statistical analyses were performed with the software Statistica 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK).

RESULTS

Pro-oxidant Capacity of Atlantic Pollock, Seabass, and Horse Mackerel Hemoglobins in Liposomes and Washed Minced Fish Muscle. The capacity of each fish hemoglobin to catalyze lipid oxidation was evaluated in two different systems, liposomes and washed minced muscle from horse mackerel. In liposomes, all fish hemoglobins at a concentration of 3 μM produced an extensive generation of both primary and secondary lipid oxidation products, represented, respectively, by conjugated dienes and TBARS, after 3 h of incubation at 30 °C (Figure 1). In contrast, control liposomes without hemoglobin supplemented did not exhibit a significant increment of those lipid oxidation products during the same incubation time, thus demonstrating the capacity of the studied hemoglobins to promote lipid oxidation in liposomes. From the comparison of the different fish hemoglobins, pollock Hb was found to be significantly the strongest promoter of conjugated dienes ($p < 0.05$), followed in decreasing order by horse mackerel Hb and seabass Hb (Figure 1A). TBARS formation also indicated a lower pro-oxidative activity for seabass Hb than for pollock and mackerel hemoglobins (Figure 1B). Moreover, pollock Hb produced a more elevated amount of TBARS during the initial propagation stages of lipid oxidation (20–40 min) than horse mackerel Hb. However, the pro-oxidative activities of both hemoglobins were similar in terms of TBARS values after longer incubation times. In summary, fish hemoglobins exhibited different pro-oxidative effectiveness in liposomes, and the relative order of activity was found to be pollock Hb > horse mackerel Hb > seabass Hb.

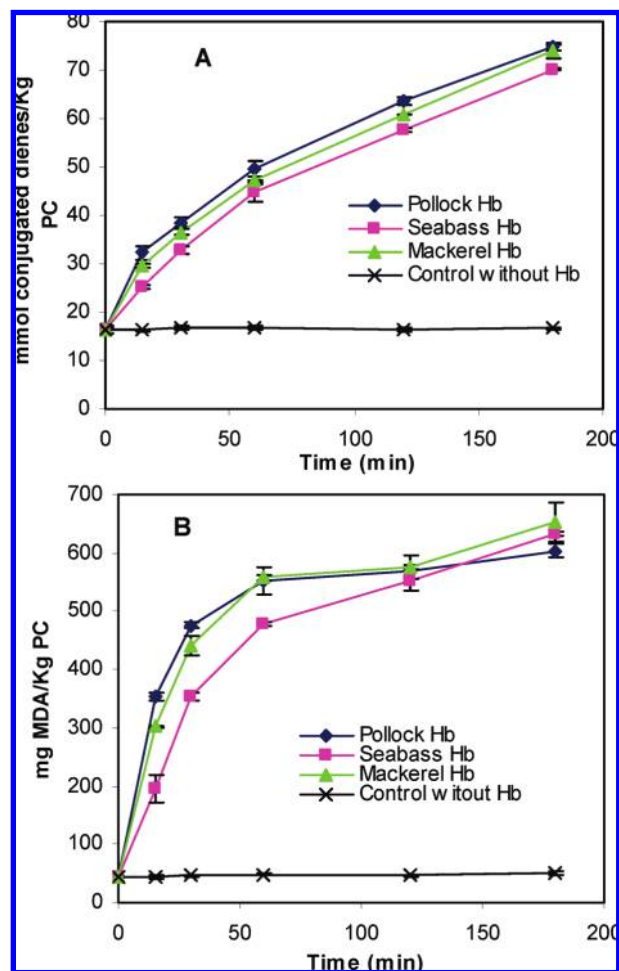


Figure 1. Pro-oxidative capacity of Atlantic pollock, seabass, and horse mackerel Hb in liposomes by monitoring the formation of conjugated dienes (A) and TBARS (B). Liposomes were prepared in 50 mM phosphate buffer at pH 6.8, supplemented with fish Hb at 3 μM and incubated at 30 °C.

Washed minced fish muscle provided an appropriate model system to investigate the activity of hemoglobin in relation to lipid oxidation under controlled physiological levels. It provides a matrix that has the structure of fish muscle, that is, with intact myofibril proteins and membrane lipids, but virtually free of heme pigments (20). Washed minced muscle from horse mackerel light muscle with lipid content and moisture of, respectively, 0.67 ± 0.05 and $84.2 \pm 0.8\%$, was supplemented with 3 μmol of hemoglobin/kg of muscle. The addition of hemoglobin produced an extensive generation of lipid peroxides and TBARS during 5 days of storage at 4 °C (Figure 2). Conversely, control washed muscle without supplemented fish hemoglobin did not exhibit a significant formation of lipid oxidation products. Supplementation with pollock Hb produced a severe increment of lipid peroxides at day 2, which decreased subsequently after day 3. Mackerel Hb and seabass Hb were found to be less active in promoting the formation of lipid peroxides because both formation rate and maximum value of lipid peroxides were significantly lower than those corresponding to pollock Hb (Figure 2A). Seabass Hb was less active than mackerel Hb in the promotion of peroxides during the propagation phase of lipid oxidation (2–4 days). The pro-oxidative pattern found for TBARS values was similar to that observed for peroxides: pollock Hb > horse mackerel Hb > seabass Hb (Figure 2B).

Relative Oxygenation and Rates of Autoxidation and Spontaneous Hemin Loss for Atlantic Pollock, Horse Mackerel, and Seabass Hemoglobins. The relative affinity of hemoglobins to

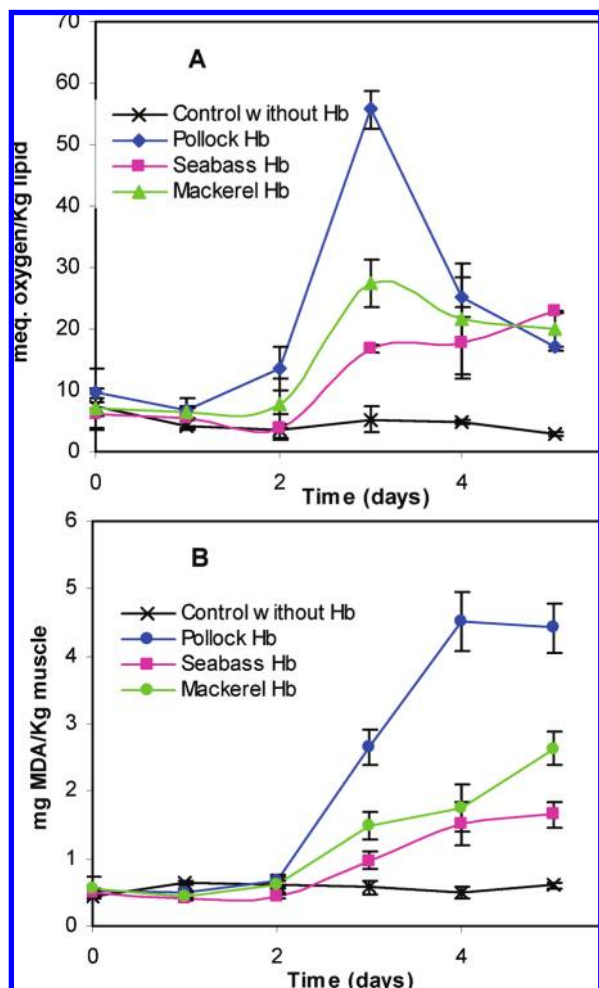


Figure 2. Pro-oxidative capacity of Atlantic pollock, seabass, and horse mackerel Hb in washed minced horse mackerel muscle by monitoring the formation of lipid peroxides (A) and TBARS (B). Washed minced muscle was supplemented with fish Hb at 3 $\mu\text{mol/kg}$ of muscle and incubated at 4 $^{\circ}\text{C}$.

bind oxygen and their rates of autoxidation and hemin loss were evaluated at pH 6.8 and 4 $^{\circ}\text{C}$, conditions in which the lipid oxidation experiments were conducted. There were significant differences in the relative oxygen-binding affinity of hemoglobins, showing pollock Hb with lower initial oxygenation, followed by horse mackerel Hb and then seabass Hb, which presented the strongest relative oxygenation state (Table 1).

Concerning the spontaneous oxidation of hemoglobin to metHb, the results clearly indicated a net formation of 1.7 μM metHb for pollock Hb after 1 day of incubation, followed by a reduction of metHb levels between days 4 and 8 (Figure 3A). Seabass and mackerel hemoglobins exhibited higher stability, and so, the levels of metHb remained practically constant for both hemoglobins during the entire period of incubation, 9 days. A significant feature was found to be the lower initial metHb levels for seabass Hb (0.5 μM) in comparison with those from horse mackerel and pollack, the initial values of metHb of which were found to be 1.5 and 1.7 μM , respectively. The higher initial metHb levels for horse mackerel Hb than for seabass Hb suggested a higher susceptibility of horse mackerel Hb to be oxidized to metHb.

The ability of fish hemoglobins to lose hemin spontaneously was also investigated in those samples employed to study autoxidation. The results showed that pollock Hb released an amount

Table 1. Relative Oxygenation State of Atlantic Pollock, Seabass, and Horse Mackerel Hb in 50 mM Phosphate Buffer, pH 6.8^a

	relative oxygenation, absorbance (peak 575 nm – valley 560 nm) \times 1000
pollock	30.2 \pm 2.1
seabass	86.7 \pm 0.8
horse mackerel	64.6 \pm 0.8

^aThe difference in absorbance between the peak (574 nm) and the valley (560 nm) was used to estimate the relative oxygenation.

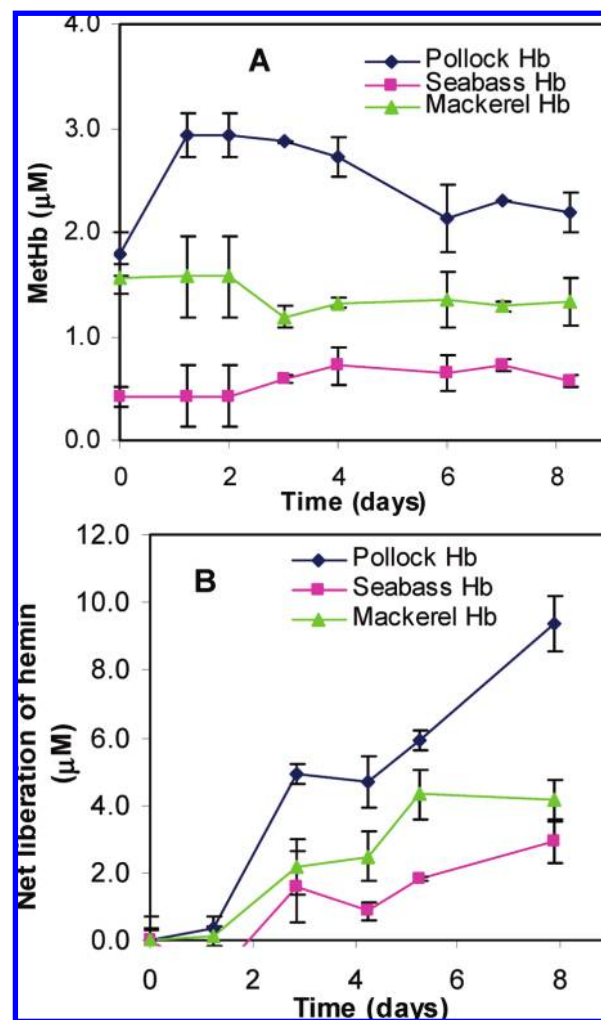


Figure 3. Autoxidation (A) and spontaneous hemin loss (B) of Atlantic pollock, seabass, and horse mackerel Hb. Fish Hb was diluted to 5 μM in 50 mM phosphate buffer, pH 6.8, and incubated at 4 $^{\circ}\text{C}$.

higher than 4 μM hemin between days 1 and 3, whereas approximately 5 μM hemin was discharged between days 4 and 8 (Figure 3B). Horse mackerel and seabass hemoglobins showed higher hemin affinity considering the lower spontaneous hemin loss in comparison to pollack Hb. There were also differences between hemin affinities of seabass and horse mackerel Hb, making horse mackerel Hb more vulnerable to loss hemin. In conclusion, the spontaneous loss of hemin was found to be faster for pollack Hb > horse mackerel Hb > seabass Hb.

MetHb Formation and Hemin Loss in the Presence of Linolein Hydroperoxides and *trans*-2-Pentenal. Fish hemoglobins were incubated with a primary and secondary lipid oxidation product, linolein hydroperoxides and *trans*-2-pentenal, respectively, to evaluate the vulnerability of hemoglobins to undergo metHb formation and hemin loss during the development of lipid

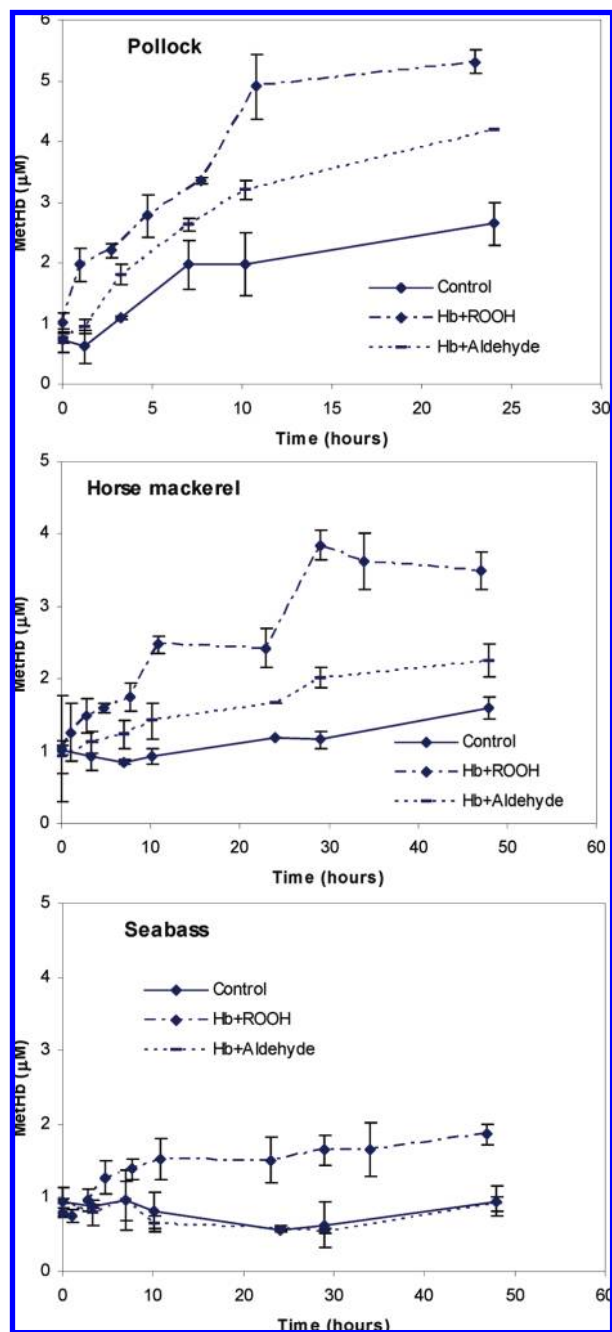


Figure 4. Oxidation to metHb of Atlantic pollock, horse mackerel, and seabass Hb by incubation with linolein hydroperoxides and *trans*-2-pentenal. Fish Hb was diluted to 5 μ M in 50 mM phosphate buffer, pH 6.8, and incubated at 4 $^{\circ}$ C. The final concentrations of linolein hydroperoxides and *trans*-2-pentenal were 125 and 1000 μ M, respectively.

oxidation reactions. The incubation of 5 μ M hemoglobin with 125 μ M linolein hydroperoxides accelerated notably the generation of metHb for all hemoglobins. The relative susceptibility to undergo oxidation to metHb was similar to that found spontaneously in the absence of hydroperoxides: pollock Hb > horse mackerel Hb > seabass Hb (Figure 4). The interaction with *trans*-2-pentenal (1000 μ M) also raised the rate of metHb formation in the case of pollock Hb and, to a lower extent, for horse mackerel Hb. On the contrary, seabass Hb was not significantly affected by *trans*-2-pentenal in terms of metHb formation, and therefore, seabass Hb did not produce a significant generation of metHb even in the presence of *trans*-2-pentenal. Consequently, the susceptibility of fish hemoglobins to generate metHb in the

presence of *trans*-2-pentenal had a result similar to that found in the presence of linolein hydroperoxides: pollock Hb > horse mackerel Hb > seabass Hb (Figure 4). It is a relevant fact that linolein hydroperoxides were more effective than *trans*-2-pentenal in inducing the generation of metHb, even when *trans*-2-pentenal was employed in a concentration 8-fold higher compared to hydroperoxides.

With regard to the effect of linolein hydroperoxides and *trans*-2-pentenal on the release of heme by hemoglobins, the aldehyde was significantly more active than linolein hydroperoxides in promoting the generation of free heme (Figure 5). However, these results should be considered carefully because heme can be easily destroyed by interaction with preformed lipid hydroperoxides (9) and because linolein hydroperoxides originated a higher formation of metHb, which possesses a weaker affinity by heme than the corresponding fish hemoglobin (conclusion inferred from the observation of the spontaneous heme loss of metHb and fish Hb).

The interaction with linolein hydroperoxides (125 μ M) increased the amount of free heme for seabass Hb in comparison with control hemoglobin not supplemented with hydroperoxide and, to a lower degree, raised free heme for horse mackerel Hb. On the contrary, linolein hydroperoxides apparently did not have an effect on the release of heme by pollock Hb. Therefore, linolein hydroperoxides produced apparently a stronger release of heme for seabass Hb, which has exhibited the lower spontaneous heme loss, whereas hemoglobin with the fastest spontaneous heme loss (pollock Hb) did not raise the free heme content by interaction with hydroperoxides. These results seem to point to an important destruction of heme by hydroperoxide-derived free radicals in the case of those fish hemoglobin with lower heme affinity.

All fish hemoglobins increased the amount of free heme by incubation with *trans*-2-pentenal, but still pollock Hb originated the most rapid generation of free heme (Figure 5). With regard to hemoglobins from horse mackerel and seabass, both showed a similar pattern for the release of heme by interaction with *trans*-2-pentenal.

Prooxidant Capacity of Pollock, Horse Mackerel, and Seabass MetHb in Liposomes and Washed Minced Fish Muscle. The capacity of the metHb forms to promote lipid oxidation was compared with that found for free heme and fish Hbs, mainly found in reduced state. All hemoglobin species and heme were tested at the same heme molar concentration. In liposomes, metHb from pollock and horse mackerel catalyzed to a higher extent the formation of conjugated dienes than metHb from seabass (Figure 6A). Pollock metHb was notably the most effective in promoting the formation of secondary oxidation products (TBARS), whereas horse mackerel metHb showed an intermediate activity and metHb from seabass was found to be the less active in generating TBARS (Figure 6B). Pollock metHb exhibited a more elevated pro-oxidant activity in liposomes than pollock Hb (Figure 6), and the same behavior with stronger pro-oxidative capacity for metHb compared to the corresponding oxyHb was obtained for either horse mackerel or seabass Hb (data not shown). The results also demonstrated that free heme is a weaker catalyst of lipid oxidation in liposomes than metHb species and pollock Hb (Figure 6).

The formation of primary and secondary lipid oxidation products, peroxides and TBARS, respectively, was monitored in washed minced fish muscle during incubation at 4 $^{\circ}$ C. The results showed a more elevated capacity of pollock metHb to promote either the formation of peroxides or TBARS in comparison with reduced pollock Hb (Figure 7). This tendency was also observed for horse mackerel and seabass Hb, and therefore, their

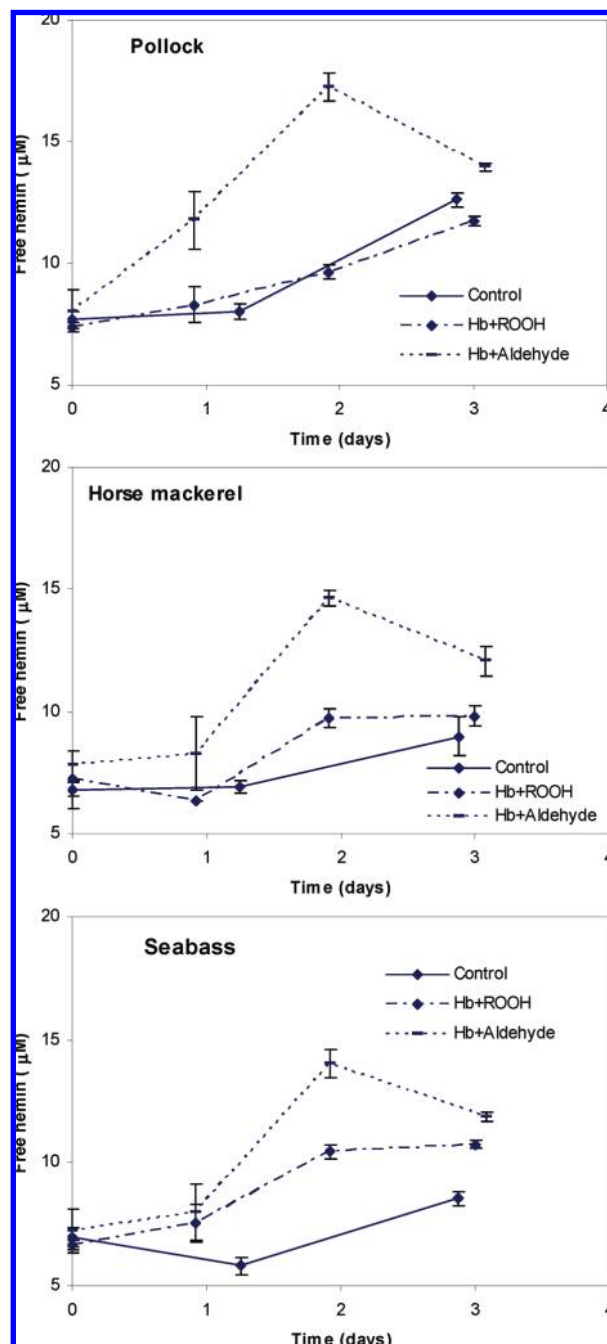


Figure 5. Hemin loss of Atlantic pollock, horse mackerel, and seabass Hb by incubation with linolein hydroperoxides and *trans*-2-pentenal. Fish Hb was diluted to $5 \mu\text{M}$ in 50 mM phosphate buffer, pH 6.8, and incubated at 4°C . The final concentrations of linolein hydroperoxides and *trans*-2-pentenal were 125 and $1000 \mu\text{M}$, respectively.

metHb forms were found to be more pro-oxidant in washed fish muscle than the corresponding oxyHb (data not shown). The relative pro-oxidant capacity of the fish metHb species was found to be similar to that achieved for the reduced hemoglobin forms in washed fish muscle, and so, pollock metHb was able to promote lipid oxidation to a higher extent, horse mackerel metHb showed an intermediate activity, and seabass metHb was found to be the weakest promoter of lipid oxidation in washed fish muscle (Figure 7). As a general rule, all metHb species were able to catalyze lipid oxidation to a higher extent than free hemin given that the formation of peroxides and TBARS was significantly slower in the case of free hemin. From the comparison with the

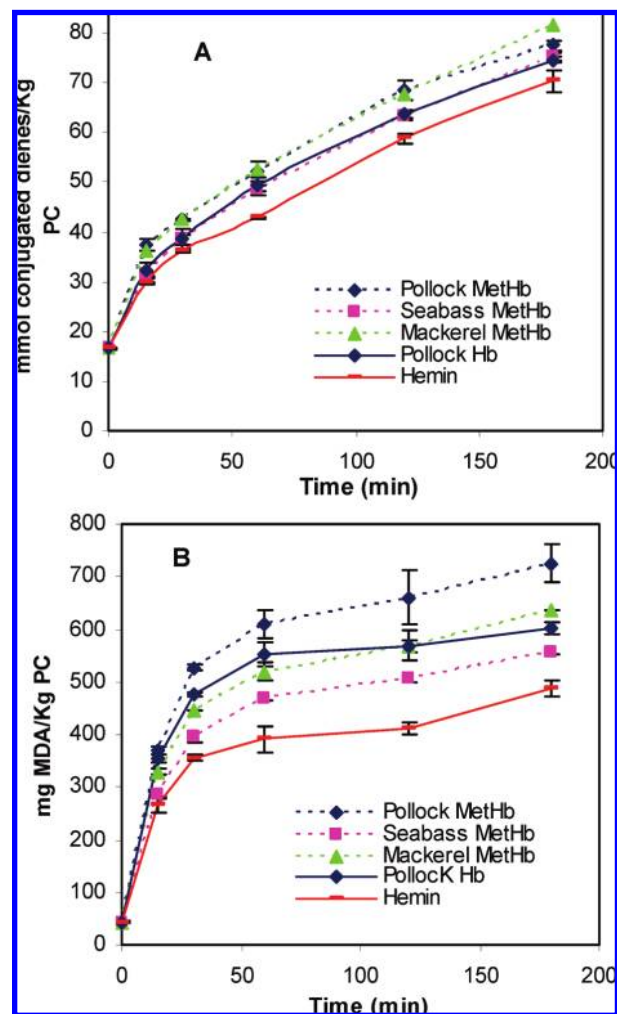


Figure 6. Pro-oxidative capacity of free hemin and metHb from Atlantic pollock, seabass, and horse mackerel in liposomes by monitoring the formation of conjugated dienes (A) and TBARS (B). Atlantic Pollock Hb was introduced as reference. Liposomes were prepared in 50 mM phosphate buffer at pH 6.8, supplemented with free hemin or metHb species at $3 \mu\text{M}$ (on Hb basis), and incubated at 30°C .

reduced Hb forms, free hemin was more pro-oxidant than horse mackerel and seabass oxyHb (data not shown).

Spontaneous Hemin Loss from Pollock, Horse Mackerel, and Seabass MetHb. The affinity of the metHb forms by hemin was evaluated in 50 mM phosphate buffer, pH 6.8, and the net liberation of hemin during the incubation period at 4°C is represented in Figure 8. Pollock metHb lost spontaneously a significant amount of hemin after 1 day of incubation, whereas hemin loss was not detected from horse mackerel and seabass metHb at the same period. The release of hemin continued to be more severe for pollock metHb during the initial 4 days but was similar to that found for horse mackerel metHb after 6–8 days of incubation (Figure 8). Seabass metHb was demonstrated to be the metHb species with the strongest affinity for hemin.

Native IEF Pattern of Pollock, Horse Mackerel, and Seabass Hemoglobins. To investigate the presence of different hemoglobin isoforms differing in isoelectric point (pI), native IEF on gel was performed on fish hemoglobins in the range of pH 3.5–9.5. The results revealed that pollock Hb included isoforms with high anodic character, which presented pI as acidic as 5.2 (Figure 9). Horse mackerel Hb contained at least one isoform more anodic than seabass Hb given that the most acidic isoforms of horse

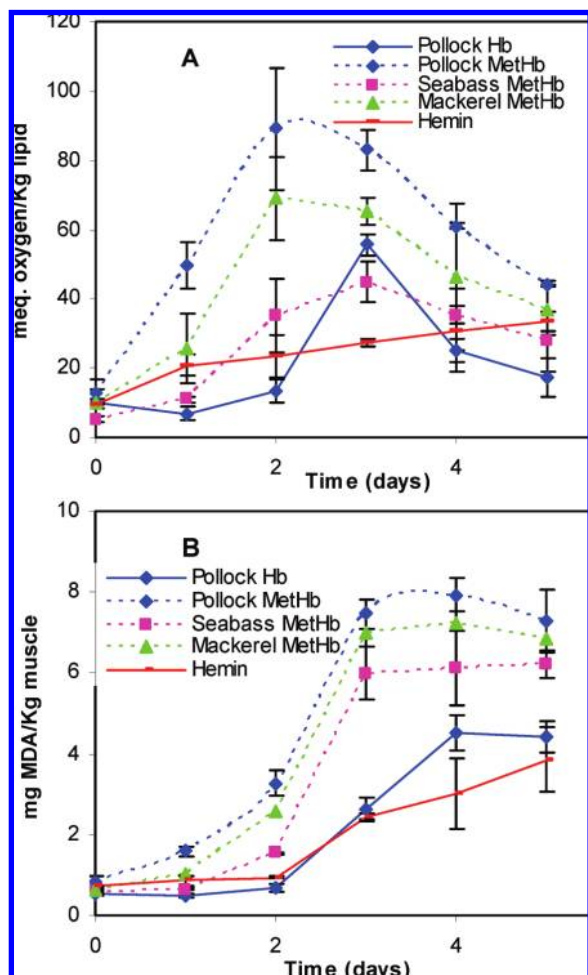


Figure 7. Pro-oxidative capacity of free hemin and methHb from Atlantic pollock, seabass, and horse mackerel in washed minced horse mackerel muscle by monitoring the formation of lipid peroxides (A) and TBARS (B). Washed minced muscle was supplemented with free hemin or methHb species at 3 $\mu\text{mol/kg}$ of muscle (on Hb basis) and incubated at 4 $^{\circ}\text{C}$.

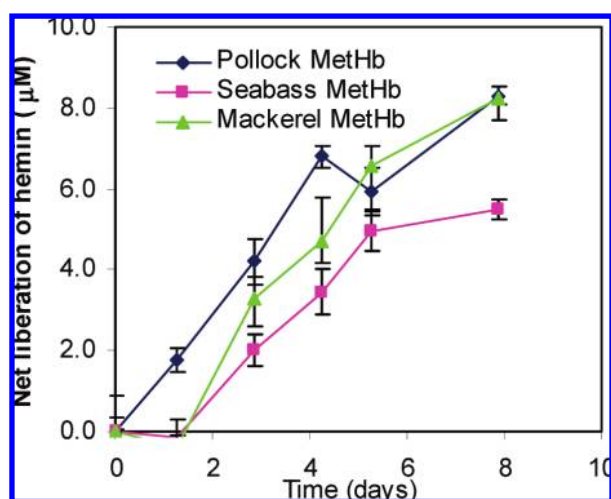


Figure 8. Spontaneous hemin loss of methHb from Atlantic pollock, seabass, and horse mackerel. MetHb was diluted to 5 μM in 50 mM phosphate buffer, pH 6.8, and incubated at 4 $^{\circ}\text{C}$.

mackerel Hb and seabass Hb were found to possess pI values of 5.5 and 5.8, respectively. As general rule, the IEF bands corresponding to pollock Hb were much more poorly defined than

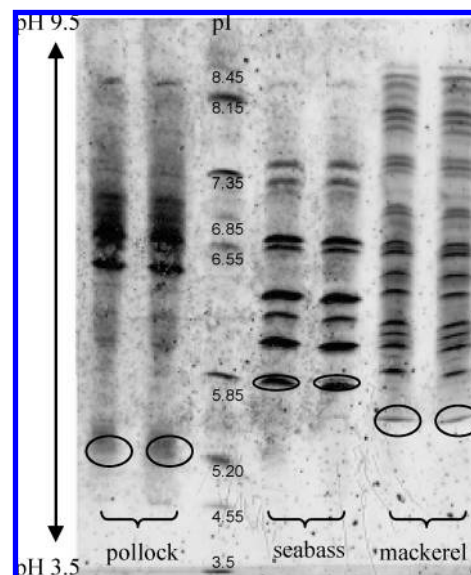


Figure 9. Native isoelectrofocusing (IEF) pattern of Atlantic pollock, seabass, and horse mackerel Hb. IEF electrophoresis was performed in the range of pH 3.5–9.5. Two lines were run with the corresponding fish Hb, and one line was run with the marker of isoelectric point (pI). Circles indicate Hb isoforms with the highest anodic character.

those for horse mackerel and seabass Hb. This could be attributed to a partial oxidative degradation of pollock Hb during the IEF, because pollock Hb was much less stable than other fish hemoglobins studied.

DISCUSSION

Pelagic species such as Atlantic mackerel and herring contain typically amounts of hemoglobin ranging from 3 to 7 μmol of hemoglobin/kg of light muscle (5, 20), whereas cod, a representative whitefish species, possesses up to 0.2 μmol of hemoglobin/kg of muscle (20). Different investigations have demonstrated that fish hemoglobins catalyze extensively lipid oxidation at those hemoglobin levels found in pelagic species (5, 21, 22), and such pro-oxidative activity of hemoglobin displays a positive concentration dependence in either washed fish muscle (5, 23) or fish membranes (6). Conversely, the incorporation of added fish triacylglycerols did not significantly enhance rates of hemoglobin-mediated lipid oxidation in washed cod muscle, the lipid substrate of which is mainly formed by phospholipids (23). Previous investigations by Igene et al. (24) reported major contributions of the phospholipid fraction in the development of rancidity in meat model systems. Therefore, the elucidation of the inherent factors of hemoglobin responsible of its pro-oxidative activity should be valuable information to develop a new generation of antioxidant strategies to inhibit lipid oxidation in meat-based foods.

Our results clearly indicate a higher pro-oxidant potential for pollock Hb than for seabass Hb in washed fish muscle, whereas hemoglobin from horse mackerel has an intermediate activity (Figure 2). In liposomes, there are much lower differences among the activities of fish hemoglobins, but still, pollock Hb and seabass Hb were the strongest and poorest promoters of lipid oxidation, respectively (Figure 1). Undeland et al. (21) have shown a much higher catalytic activity promoting lipid oxidation in a washed fish muscle for pollock Hb, followed in decreasing order by mackerel > menhaden > flounder. Richards et al. (22) have reported that mackerel and herring hemoglobins oxidized washed fish muscle more rapidly as compared to trout

hemoglobin. Trout hemoglobin has also exhibited a more elevated pro-oxidative ability than hemoglobin from tilapia (*Oreochromis niloticus*), a warm-water fish species (25). Most of these studies have related the pronounced pro-oxidant capacity of fish hemoglobins with high autooxidation rates and poor oxygenation, and the present investigation points to the same tendency. The relative deoxygenation and autooxidation rate followed the order pollock Hb > horse mackerel Hb > seabass Hb (Table 1 and Figure 3), according to the high content in anodic isoforms for pollock Hb (Figure 9). It has been previously described that anodic isoforms have poor oxygen affinity at the pH values normally found in post-mortem fish muscle (26) and that the deoxygenation state makes the ferrous Hb molecule less compact (27, 28). In addition, the present investigation has also revealed an extensive spontaneous liberation of heme for those fish Hbs possessing greater pro-oxidative activity (pollock Hb > horse mackerel Hb > seabass Hb). Therefore, the capacity to catalyze lipid oxidation appears to be related to at least two inherent factors of fish Hb, rapid formation of metHb and unforced heme liberation, which are directly involved in two principal pro-oxidative mechanisms: (i) the formation of highly oxidizing ferryl Hb radicals and (ii) the generation of free radicals through lipid hydroperoxide decomposition. The similar relative susceptibility of fish Hb to be oxidized to metHb and to release heme can be explained by the poor heme affinity observed for metHb species (Figure 8).

The present investigation is new evidence of a much higher pro-oxidative activity for metHb species compared to the corresponding reduced Hb forms and free heme (Figures 6 and 7). It is in concordance with a previous study that showed more severe promotion of lipid oxidation for met forms of recombinant wild-type sperm whale Mb than for the ferrous forms in washed cod muscle (29). Additionally, the same research demonstrated that heme alone was less effective as a lipid oxidation promoter than heme in the presence of bovine serum albumin. Taking into consideration that metHb does not exhibit superior capacity than ferrous Hb to generate free radicals through hydroperoxide fragmentation (9), the stronger capacity of metHb to promote lipid oxidation is hypothesized to be due to a more significant efficiency to produce ferryl Hb radical species, which is able to initiate lipid peroxidation by direct abstraction of a hydrogen atom from a PUFA. Reeder and Wilson (30) demonstrated that metMb reacts with the lipid hydroperoxide hydroperoxyoctadecadienoic acid to render mainly the ferryl Mb form, whereas changes for the oxyMb are more complex, with ferrous, ferric, and ferryl species present. The stronger pro-oxidative ability observed for metHb than for free heme appears to indicate a more decisive contribution of the metHb formation on the pro-oxidative activity of hemoglobin. However, the liberation of heme may have a central role at the initial stages of lipid oxidation, considering the rapid and extensive promotion of free radicals by free heme under conditions of low hydroperoxide/heme ratios (9). Indeed, free heme was significantly more effective than the most pro-oxidant Hb, pollock Hb, in catalyzing the formation of lipid peroxides during the initial phase of lipid oxidation in washed fish muscle (Figure 7A).

An important achievement of the present study was to elucidate the influence of two representative primary and secondary lipid oxidation byproducts on metHb formation and heme liberation. Lipid oxidation generates a wide range of secondary aldehyde products including *n*-alkanals, *trans*-2-alkenals, 4-hydroxy-*trans*-2-alkenals, and malonaldehyde (31). The volatile *trans*-2-pentenal has been detected as a lipid oxidation product either in fish oil enriched emulsion (32) or in fish muscle (33). The interaction of the fish hemoglobins with either *trans*-2-pentenal or

linolein hydroperoxides significantly accelerates the formation of metHb without modifying the relative redox stability of hemoglobins (Figure 4). Heme liberation is stimulated by the presence of *trans*-2-pentenal (Figure 5), whereas linolein hydroperoxides induce lower levels of free heme, probably due to the facility of the free radicals generated during the heme/hydroperoxide interaction to decompose free heme (9). The generation of hydroperoxide-derived free radicals can also explain the superior destabilizing effects on Hb redox state by incubation with linolein hydroperoxides instead of *trans*-2-pentenal (Figure 4). With regard to the reaction between aldehyde products and heme proteins, Faustman et al. (34) revealed that monounsaturated aldehydes more actively accelerate metMb formation than saturated aldehydes. By using 4-hydroxynonenal (HNE) as a model, Faustman and co-workers (34, 35) have demonstrated that α,β -unsaturated aldehydes are able to modify covalently bovine and equine oxyMb through Michael addition in multiple histidine residues.

To conclude, the capacity of fish hemoglobins to catalyze lipid oxidation was found to be directly related with their intrinsic redox instability in terms of metHb formation and heme liberation: pollock Hb > horse mackerel Hb > seabass Hb. Representative primary and secondary lipid oxidation byproducts, linolein hydroperoxides and *trans*-2-pentenal, are proposed as activators of the hemoglobin-catalyzed lipid oxidation, considering their ability to accelerate metHb formation and heme liberation from hemoglobin. The present investigation puts emphasis on the importance of controlling metHb formation and heme loss to design more successful treatments against hemoglobin-promoted lipid oxidation.

ACKNOWLEDGMENT

Lorena Barros is gratefully acknowledged for her excellent technical assistance in the IEF electrophoresis methodology.

LITERATURE CITED

- (1) Frankel, E. N. *Lipid Oxidation*; The Oily Press: Dundee, Scotland, 1998.
- (2) Erickson, M. C. Lipid oxidation of muscle foods. In *Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*; Akoh, C. C., Min, D. B., Eds.; Dekker: New York, 2002; pp 365–411.
- (3) Richards, M. P.; Dettman, M. A. Comparative analysis of different hemoglobins: Autooxidation, reaction with peroxide, and lipid oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3886–3891.
- (4) Richards, M. P.; Modra, A. M.; Li, R. Role of deoxyhemoglobin in lipid oxidation of washed cod muscle mediated by trout, poultry and beef hemoglobins. *Meat Sci.* **2002**, *62*, 157–163.
- (5) Richards, M. P.; Hultin, H. O. Contribution of blood and blood components to lipid oxidation in fish muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 555–564.
- (6) Pazos, M.; Medina, I.; Hultin, H. O. Effect of pH on hemoglobin-catalyzed lipid oxidation in cod muscle membranes in vitro and in situ. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3605–3612.
- (7) O'Brien, P. J. Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide. I. Decomposition of a lipid peroxide by metal ions, heme compounds and nucleophiles. *Can. J. Biochem.* **1969**, *47*, 485–492.
- (8) Pazos, M.; Lois, S.; Torres, J. L.; Medina, I. Inhibition of hemoglobin- and iron-promoted oxidation in fish microsomes by natural phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4417–4423.
- (9) Pazos, M.; Andersen, M. L.; Skibsted, L. H. Heme-mediated production of free radicals via preformed lipid hydroperoxide fragmentation. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11478–11484.
- (10) Kanner, J. Oxidative processes in meat and meat products quality implications. *Meat Sci.* **1994**, *36*, 169–189.
- (11) Richards, M. P.; Hultin, H. O. Effect of pH on lipid oxidation using trout hemolysate as a catalyst: a possible role for deoxyhemoglobin. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3141–3147.

- (12) Svistunenko, D. A.; Dunne, J.; Fryer, M.; Nicholls, P.; Reeder, B. J.; Wilson, M. T.; Bigotti, M. G.; Cutruzzola, F.; Cooper, C. E. Comparative study of tyrosine radicals in hemoglobin and myoglobins treated with hydrogen peroxide. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 2845–2855.
- (13) Brown, W. D. Chromatography of myoglobin on diethylaminoethyl cellulose columns. *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 2238–2240.
- (14) Winterbourn, C. C. Oxidative reaction of hemoglobin. In *Methods in Enzymology. Oxygen Radicals in Biological Systems*; Packer, L., Glazer, A. N., Eds.; Academic Press: London, U.K., 1990; Vol. 186, pp 265–272.
- (15) Huang, S. W.; Frankel, E. N. Antioxidant activity of tea catechins in different lipid systems. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3033–3038.
- (16) Frankel, E. N.; Huang, S. W.; Kanner, J.; German, J. B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1054–1059.
- (17) Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in Enzymology: Biomembranes. Specialized Techniques*; Fleischer, S., Packer, L., Eds.; Academic Press: New York, 1978; Vol. 52, pp 302–310.
- (18) Chapman, R. A.; Mackay, K. The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1949**, *26*, 360–363.
- (19) McDonald, R. E.; Hultin, H. O. Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle. *J. Food Sci.* **1987**, *52*, 15–21.
- (20) Larsson, K.; Almgren, A.; Undeland, I. Hemoglobin-mediated lipid oxidation and compositional characteristics of washed fish mince model systems made from cod (*Gadus morhua*), herring (*Clupea harengus*), and salmon (*Salmo salar*) muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9027–9035.
- (21) Undeland, I.; Kristinsson, H. G.; Hultin, H. O. Hemoglobin-mediated oxidation of washed minced cod muscle phospholipids: effect of pH and hemoglobin source. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4444–4451.
- (22) Richards, M. P.; Hultin, H. O. Effects of added hemolysate from mackerel, herring and rainbow trout on lipid oxidation of washed cod muscle. *Fish. Sci.* **2003**, *69*, 1298–1300.
- (23) Undeland, I.; Hultin, H. O.; Richards, M. P. Added triacylglycerols do not hasten hemoglobin-mediated lipid oxidation in washed minced cod muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6847–6853.
- (24) Igene, J. O.; Pearson, A. M. Role of phospholipids and triglycerides in warmed-over flavor development in meat model systems. *J. Food Sci.* **1979**, *44*, 1285–1290.
- (25) Richards, M. P.; Nelson, N. M.; Kristinsson, H. G.; Mony, S. S. J.; Petty, H. T.; Oliveira, A. C. M. Effects of fish heme protein structure and lipid substrate composition on hemoglobin-mediated lipid oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3643–3654.
- (26) Harrington, J. P. Structural and functional studies of the king salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, hemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **1986**, *84*, 111–116.
- (27) Stryer, L. Oxygen-transporting proteins: myoglobin and hemoglobin. In *Biochemistry*; Freeman, W. H., Ed.; New York, 1988; pp 143–176.
- (28) Richards, M. P.; Ostdal, H.; Andersen, H. J. Deoxyhemoglobin-mediated lipid oxidation in washed fish muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1278–1283.
- (29) Grunwald, E. W.; Richards, M. P. Mechanisms of heme protein-mediated lipid oxidation using hemoglobin and myoglobin variants in raw and heated washed muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8271–8280.
- (30) Reeder, B. J.; Wilson, M. T. Mechanism of reaction of myoglobin with the lipid hydroperoxide hydroperoxyoctadecadienoic acid. *Biochem. J.* **1998**, *330*, 1317–1323.
- (31) Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *11*, 81–128.
- (32) Iglesias, J.; Lois, S.; Medina, I. Development of a solid-phase microextraction method for determination of volatile oxidation compounds in fish oil emulsions. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1163*, 277–287.
- (33) Iglesias, J.; Medina, I. Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1192*, 9–16.
- (34) Faustman, C.; Liebler, D. C.; McClure, T. D.; Sun, Q. α,β -unsaturated aldehydes accelerate oxymyoglobin oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3140–3144.
- (35) Suman, S. P.; Faustman, C.; Stamer, S. L.; Liebler, D. C. Proteomics of lipid oxidation-induced oxidation of porcine and bovine oxymyoglobins. *Proteomics* **2007**, *7*, 628–640.

Received February 26, 2009. Revised manuscript received June 5, 2009. Accepted June 17, 2009. This investigation has been supported by the Spanish Ministry of Science (Grant PPQ AGL2006-12210-C03-01). The Spanish Ministry of Science and CSIC are also gratefully acknowledged for a doctoral fellowship to R.M. and a postdoctoral-JAE contract to M.P., respectively.

1.3 PUBLICACIÓN

Capacity of Reductants and Chelators to Prevent Lipid Oxidation Catalyzed by Fish Hemoglobin

Rodrigo Maestre, Manuel Pazos, Jacobo Iglesias and Isabel Medina

J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 9190–9196

Capacity of Reductants and Chelators To Prevent Lipid Oxidation Catalyzed by Fish Hemoglobin

RODRIGO MAESTRE, MANUEL PAZOS,* JACOBO IGLESIAS, AND ISABEL MEDINA

Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Eduardo Cabello 6, E-36208 Vigo, Spain

The efficiency of different reductants (reduced glutathione, ascorbic acid, and catalase) and metal chelators [ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), citric acid, sodium tripolyphosphate (STPP), and adenosine-5'-triphosphate (ATP)] to inhibit lipid oxidation promoted by fish hemoglobin was investigated. The inhibitory activity on hemoglobin-catalyzed lipid oxidation was also evaluated for grape oligomeric catechins (proanthocyanidins), which have both reducing and chelating properties. The antioxidant activity was studied in two different lipid oxidation models, liposomes and washed minced fish muscle. Grape proanthocyanidins were found to be significantly more effective than other reductants to prevent hemoglobin-mediated lipid oxidation in both liposomes and washed fish muscle. Reduced glutathione was also efficient to retard lipid oxidation at the same molarity in washed fish muscle, whereas catalase and ascorbic acid showed a lower antioxidant activity. Metal chelators were less active than reductants, and consequently, the former were necessarily evaluated at much higher concentration than grape proanthocyanidins and reducing compounds. STPP was found to be the iron chelator with the strongest efficiency to delay hemoglobin-mediated lipid oxidation followed by EDTA. Citric acid and ATP were ineffective in retarding lipid oxidation in both systems. Grape proanthocyanidins provided the most extensive protection to preserve hemoglobin at ferrous state in washed fish muscle. Our results draw attention to the greater capacity of reducing compounds to prevent fish hemoglobin-mediated lipid oxidation in comparison with iron chelators, suggesting that the free radical scavenging and/or reduction of ferrylHb species are crucial actions to avoid the pro-oxidant capacity of fish hemoglobin.

KEYWORDS: Lipid oxidation; fish hemoglobin; antioxidant; reductant; iron chelator; grape proanthocyanidins

INTRODUCTION

Lipid oxidation is a principal cause of quality deterioration and shelf life shortening in seafood products, having a negative effect on flavor, color, texture, nutritive value, and safety during storage and processing (1). The vulnerability of fish muscle to develop lipid oxidation is partially attributed to the coexistence of high proportions of easily oxidizable polyunsaturated fatty acids (PUFAs) with catalytic amounts of heme proteins and redox-active metals, which are able to initiate and propagate oxidative degradations on PUFAs (2, 3).

It is described that dark-muscle fish species have higher hemoglobin levels than lean fish species (4). Hemoglobin has been found to be the predominant heme protein in mackerel light muscle (6 μmol of hemoglobin/kg) and trout whole muscle (11 μmol of hemoglobin/kg), while myoglobin and hemoglobin are abundantly present in mackerel dark muscle (5). Fish hemoglobin has demonstrated the capacity to trigger lipid oxidation in fish membranes (6, 7), liposomes (8), and also in a matrix similar to fish muscle but devoid of hemoglobin such as washed fish muscle (5, 8, 9).

Several pathways have been proposed to contribute to the pro-oxidant activity of hemoglobin: (i) generation of chain-propagating free radicals (peroxyl, alkoxyl, etc.) through fragmentation of lipid hydroperoxides (10); (ii) abstraction of hydrogen atoms from PUFAs by hypervalent ferrylHb species, which can be formed by reaction of ferric metHb with hydrogen peroxide (H_2O_2) or lipid hydroperoxides (3); and (iii) release of inorganic iron ions and heme (oxidized form of heme group) from hemoglobin (11). Ferrous ions are well-recognized lipid oxidation promoters through the Fenton reaction to produce the highly oxidizing hydroxyl radical in the presence of H_2O_2 (3). Heme, ferrous ions, and, to a lesser extent, ferric ions can also activate lipid oxidation by decomposition of preformed lipid hydroperoxides to generate free radicals (10, 12). A previous study revealed that different lipid oxidation byproducts (hydroperoxides and aldehydes) accelerate hemoglobin oxidation to metHb and heme release and that fish hemoglobins with stronger pro-oxidant capacities are those with weaker resistance to undergo oxidation to metHb and heme loss (8). The coexistence of multiple pro-oxidant mechanisms that are influenced by the dynamic formation of lipid oxidation byproduct adds complexity to the pro-oxidant scheme of hemoglobin.

The supplementation of bioactive compounds with antioxidant properties is an emerging strategy to inhibit undesirable lipid

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 986 231930. Fax: +34 986 292762. E-mail: mpazos@iim.csic.es.

oxidative reactions catalyzed by hemoglobin in meat-based food. An important activity to retard fish hemoglobin-catalyzed lipid oxidation has recently been recognized for compounds of diverse sources, such as press juice from different skeletal muscle (13, 14), cranberry concentrate juice powder (15), white grape dietary fiber (16), and white grape pomace (7). However, more research is required to get comprehensible information about which of the pro-oxidative mechanisms attributed to hemoglobin have major contributions in muscle-based foods and about which are the essential physicochemical properties to formulate effective antioxidant additives to prevent hemoglobin-promoted lipid oxidation.

The aim of the present paper was to get more insight on efficient procedures based on antioxidant additives to prevent hemoglobin-mediated lipid oxidation. Several compounds bearing reducing capacity (reduced glutathione (GSH), ascorbic acid, and catalase) or iron-chelating ability [ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), citric acid, sodium tripolyphosphate (STPP), and adenosine-5'-triphosphate (ATP)] and both reducing and chelating properties (grape proanthocyanidins) were evaluated as antioxidants against fish hemoglobin-catalyzed lipid oxidation. The antioxidant activity was investigated in two different models, liposomes and washed minced fish muscle, which are considered adequate to investigate the pro-oxidant capacity of hemoglobin since both are highly concentrated in membrane lipids, primary substrates of lipid oxidation, and are devoid of hemoglobin. Atlantic Pollock Hb was selected to trigger oxidation due to its extensive pro-oxidative activity in both systems (8), with the purpose of evaluating antioxidant abilities under drastic oxidative conditions. The effect of reductants and iron chelators on hemoglobin redox stability was also studied by measuring the loss of redness in washed fish muscle. Finally, the capacity of grape proanthocyanidins to avoid hemoglobin autooxidation was evaluated in vitro.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Atlantic pollock (*Pollachius pollachius*) and horse mackerel (*Trachurus trachurus*) were obtained fresh in the rigor state from a local market. Bovine hemoglobin, sodium heparin, sodium chloride, tris[hydroxymethyl]aminomethane (Tris), sodium dithionite, dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), lecithin from soybean with a 30% L- α -phosphatidylcholine, thiobarbituric acid, trichloroacetic acid, 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP), butylated hydroxytoluene (BHT), $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, streptomycin sulfate, ascorbic acid, catalase, GSH, citric acid, EDTA, ATP, STPP, L-histidine, and potassium chloride (KCl) were purchased from Sigma (Steinheim, Germany). Carbon monoxide (99.97% purity) was provided by Air Liquide (Porriño, Spain). Grape proanthocyanidins were kindly supplied by Dr. M. J. Nuñez (Universidad de Santiago de Compostela). All chemicals and solvents used were either analytical or high-performance liquid chromatography grade (Merck, Darmstadt, Germany).

Grape Proanthocyanidins. A grape fraction rich in oligomeric catechins (proanthocyanidins) was prepared by fractionation of a commercial grape seed extract (Le Grandonnet, Cruviens-Lascours, France) that contained 40% proanthocyanidins. Fractionation was performed by size exclusion chromatography based on Toyopearl resin as previously described Torres et al. (17). Grape proanthocyanidins were characterized in terms of mean molecular weight, mean polymerization degree, and percentage of galloylation (presence of esters with galloyl moieties) by depolymerization with cysteamine according to Torres and Lozano (18). Mean molecular weight, polymerization degree, and galloylation percentage were found to be 760 g/mol, 2.4 units, and 15%, respectively.

Fish Hemoglobin Extraction. Blood was obtained from the caudal vein with a transfer glass pipet rinsed with 150 mM NaCl and sodium heparin solution (30 units/mL) after cutting off the tail of Atlantic pollock in the rigor state. In the experiments conducted to evaluate in vitro a potential effect of grape proanthocyanidins on redox stability of fish hemoglobin, blood was isolated from horse mackerel since more stable fish hemoglobin was required. Blood was immediately mixed with

approximately 1 volume of the saline sodium heparin solution, and hemolysate was then prepared according to Richards and Hultin (19). Either pollock or horse mackerel hemoglobin was predominantly oxygenated as indicated the appearance of two well-defined absorption peaks at approximately 540 and 570 nm, which are attributed to oxygenated Hb (OxyHb). Hemoglobin was stored at -80°C and thawed just before used.

Determination of Hemoglobin Concentration. Hemoglobin was quantified according to Brown (20). Briefly, hemoglobin was diluted in 50 mM Tris buffer, pH 8.6, mixed with around 1 mg of sodium dithionite, and bubbled with carbon monoxide gas for 20 s. The samples were then scanned from 400 to 480 nm against a blank that contained only Tris buffer. A standard curve was built by relating the absorbance at the peak (≈ 416 nm) minus the absorbance at the valley (465 nm) with known concentrations of commercial hemoglobin from bovine blood.

Effect of Grape Proanthocyanidins on in Vitro Redox Stability of Fish Hemoglobin. The experiments were conducted by incubating 10 μM horse mackerel Hb with 21 μM grape proanthocyanidins in a 5 mM L-histidine buffer with 0.12 M KCl, pH 6.8, at 4°C . These concentrations were selected to investigate the effect of grape polyphenols in a hemoglobin/polyphenolic molar ratio similar to that found when pelagic fish muscle (5–18 μmol Hb/kg muscle) is supplemented with an effective concentration of grape proanthocyanidins (50 ppm or 57 μmol /kg muscle) (21). The redox stability of hemoglobin was evaluated by monitoring the spectral changes suffered by hemoglobin in the absence or the presence of grape proanthocyanidins. The formation of metHb was calculated by adaptation of the Winterbourn's equation (22) that estimates the concentration of metHb in μM (on hemoglobin basis) considering the absorbance at 576 and 630 nm:

$$[\text{MetHb}] = \left(\frac{279A_{630} - 3A_{576}}{4} \right)$$

Inhibition of Hemoglobin-Catalyzed Lipid Oxidation in Liposomes. Liposomes were prepared by adaptation of a procedure previously described by Huang and Frankel (23). Briefly, lecithin from soybean was dissolved in a concentration of 0.8% (w/w) by magnetic stirring in the buffer solution and subsequently subjected to sonication for 10 min in a water bath ultrasonicator (P-Selecta, Barcelona, Spain). The liposomes were prepared in 50 mM phosphate buffer, pH 6.8, when reductants and grape proanthocyanidins were evaluated. In the case of the experiments conducted to test iron chelators, a buffer solution containing 5 mM L-histidine and 0.12 M KCl, pH 6.8, was employed to avoid the chelating ability of the phosphate buffer. GSH, ascorbic acid, and grape proanthocyanidins were added at 30 μM . Catalase was employed at a concentration of 200 units/L (1 unit decomposes 1 μmol H_2O_2 /min). The chelating compounds (EDTA, citric acid, STPP, and ATP) were evaluated at a much higher concentration (1 mM) because of their lower inhibitory activity. Liposomes were incubated at 30°C in a thermostatic water bath, and lipid oxidation was initiated by adding 3 μM pollock Hb. The formation of conjugated dienes and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was used to monitor the development of lipid oxidation.

Inhibition of Hemoglobin-Catalyzed Lipid Oxidation in Washed Minced Fish Muscle. Washed minced muscle was prepared from light muscle of horse mackerel by the procedure described by Richards and Hultin (5). Washed minced muscle was finally mixed with a 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, and streptomycin sulfate (200 ppm) was added to inhibit microbial growth. In those experiments conducted to test chelating compounds, the phosphate buffer was substituted by a buffer solution containing 0.12 M KCl and 5 mM L-histidine, pH 6.8, to avoid the chelating ability of the phosphate buffer. Washed fish muscle was supplemented with ascorbic acid, GSH, and grape proanthocyanidins at 60 μmol /kg muscle. Catalase was employed at a concentration of 40000 units/kg muscle (1 unit decomposes 1 μmol H_2O_2 /min). The chelating agents (EDTA, citric acid, STPP, and ATP) were added at 2 mmol/kg muscle. Lipid oxidation was initiated by adding 3 μmol pollock Hb per kg muscle and monitored by peroxide value (PV) and TBARS during storage at 4°C . The loss of redness was also investigated as an index for hemoglobin redox stability. The final moisture of the washed fish muscle ranged from 80 to 84%, and the lipid content was 0.7–0.8%.

Loss of Redness. Changes in the redness (a^* value) of washed fish muscle supplemented with Hb were measured using a colorimeter Chroma

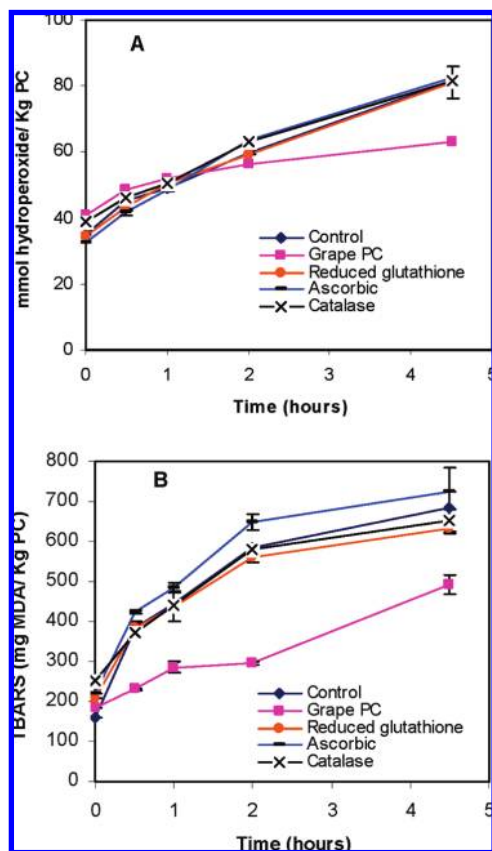


Figure 1. Antioxidant effect of reductants (GSH, ascorbic acid, and catalase) and grape proanthocyanidins on hemoglobin-mediated lipid oxidation in liposomes. GSH, ascorbic acid, and the grape proanthocyanidins were added at 30 μ M, while catalase was supplemented at 200 units/L. Lipid oxidation was triggered by adding 3 μ M pollock Hb and was monitored by following the formation of conjugated dienes (A) and TBARS (B) during incubation at 30 $^{\circ}$ C.

Meter CR-200 (Minolta Corp., Nieuwegein, Netherlands). The instrument was first calibrated using a white Minolta calibration plate. Redness (a^* value) was measured with approximately 1 g of washed muscle placed on a glass microslide and covered up with a cover glass.

Conjugated Dienes. Liposomes (100 mg) were dissolved in 3 mL of methanol, and the absorbance was measured at 234 nm (UV-vis Spectrophotometer Perkin-Elmer). Conjugated dienes were expressed as mmol hydroperoxides/kg phosphatidylcholine (PC) as previously described by Frankel and co-workers (24).

PV. PV was determined in washed minced muscle using an adaptation of the ferric thiocyanate method (25) by Buege and Aust (26). PV was expressed in milliequivalents (mequiv) of oxygen per kg of lipid.

TBARS Analysis. TBARS analysis was performed in liposomes and washed minced muscle according to the method by McDonald and Hultin (27). A standard curve was built by using TEP as standard. The results are expressed in terms of mg malonaldehyde (MDA) per kg of phosphatidylcholine (PC) or muscle, respectively, in liposomes and washed fish muscle.

Statistical Analysis. The experiments were performed twice, and data are reported as means \pm standard deviations of three replicates ($n = 3$). The data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and the least-squares difference method. Differences were considered as statistically significant for a confidential interval of 95% ($p < 0.05$). Statistical analyses were performed with the software Statistica 6.0.

RESULTS

Antioxidant Activity of Reductants and Grape Proanthocyanidins on Hemoglobin-Mediated Lipid Oxidation. The results revealed a stronger efficiency of grape proanthocyanidins to inhibit

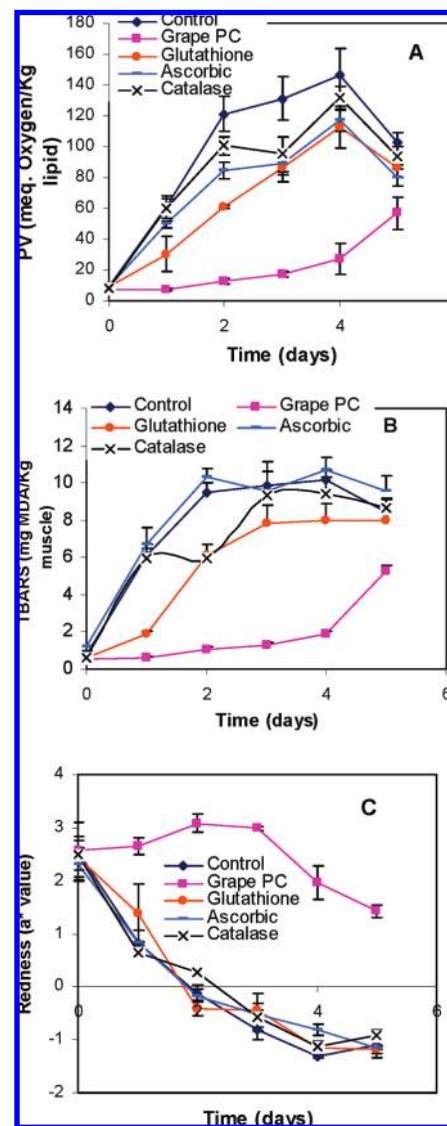


Figure 2. Antioxidant effect of reductants (GSH, ascorbic acid, and catalase) and grape proanthocyanidins on hemoglobin-mediated lipid oxidation in washed minced horse mackerel muscle. GSH, ascorbic acid, and grape polyphenols were added at 60 μ M/kg muscle, while catalase was supplemented at 40000 units/kg muscle. Lipid oxidation was triggered by adding 3 μ M of pollock Hb/kg muscle and was monitored by following the PV, TBARS, and the loss of redness (a^* value) during incubation at 4 $^{\circ}$ C.

the pollock hemoglobin-mediated formation of conjugated dienes in liposomes at the propagation stages of lipid oxidation, while GSH, catalase, and ascorbic acid were not active at the same molar concentration (30 μ M) (Figure 1A). Grape proanthocyanidins also exhibited a significant reduction of TBARS formation during the entire monitoring time (Figure 1B). However, the supplementation of liposomes with GSH and catalase was ineffective to retard the generation of TBARS, while ascorbic acid resulted to some extent pro-oxidant by promoting the formation of TBARS.

Grape proanthocyanidins also exhibited the strongest inhibitory capacity on hemoglobin-promoted lipid oxidation in washed fish muscle (Figure 2). Washed fish muscle supplemented with grape proanthocyanidins (60 μ M/kg muscle) showed induction periods for the formation of lipid peroxides and TBARS of approximately 4 days, while control muscle without the addition of exogenous reducing compounds apparently did not exhibit induction periods for the formation of those lipid oxidation

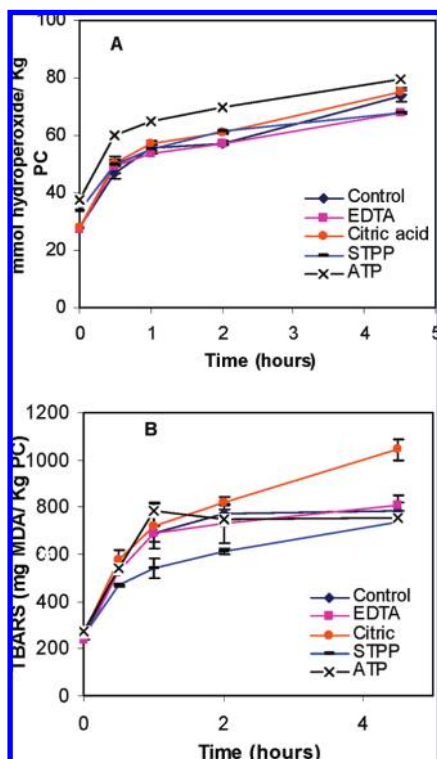


Figure 3. Antioxidant effect of iron chelators (EDTA, citric acid, STPP, and ATP) on hemoglobin-mediated lipid oxidation in liposomes. All chelating compounds were employed at 1 mM. Lipid oxidation was triggered by adding 3 μ M pollock Hb and was monitored by following the formation of conjugated dienes and TBARS during incubation at 30 °C.

products. The other reductants were not able to increase induction periods, with the exception of GSH that increased the induction period for the formation of TBARS up to 1 day (Figure 2B). GSH was also active to decrease the formation of peroxides and TBARS during the propagation of lipid oxidation. Ascorbic acid and catalase reduced to some extent the formation of peroxides, but they were not able to diminish the generation of TBARS. The effect of reductants on the oxidation rate of hemoglobin was monitored in washed fish muscle by the loss of redness. The results indicated a drastic attenuation of the redness at day 1 for control samples, whereas fish muscle supplemented with grape proanthocyanidins was able to maintain redness at initial values after 3 days of storage (Figure 2C). However, GSH, ascorbic acid, and catalase were not active to retard the loss of redness and, therefore, hemoglobin oxidation. In summary, the relative capacity of reductants to inhibit hemoglobin-promoted lipid oxidation in washed fish muscle followed the order grape proanthocyanidins \gg GSH > ascorbic acid \approx catalase.

Antioxidant Activity of Iron Chelators on Hemoglobin-Mediated Lipid Oxidation. Different iron chelators (EDTA, citric acid, STPP, and ATP) were evaluated as antioxidants to control the pro-oxidative action of the inorganic iron released from hemoglobin. The chelating compounds were tested in a wide concentration range in liposomes, and even levels of 1 mM scarcely delayed lipid oxidation in terms of formation of conjugated dienes and TBARS (Figure 3). STPP has shown a significant ability to diminish the formation of TBARS during the propagation period, but this chelator was found ineffective to prevent the generation of conjugated dienes. The other chelating compounds were not active to inhibit the formation of neither conjugated dienes nor TBARS.

In washed fish muscle, STPP was also found to be significantly more effective to delay the formation of lipid peroxides, followed

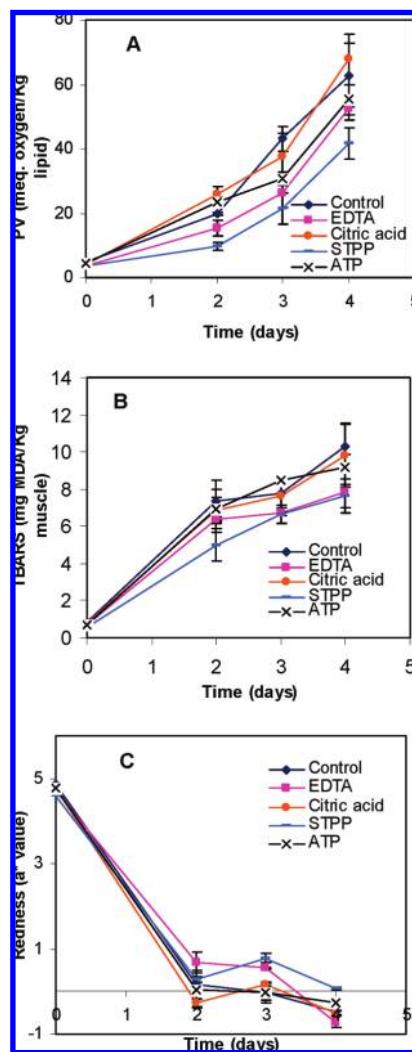


Figure 4. Antioxidant effect of iron chelators (EDTA, citric acid, STPP, and ATP) on hemoglobin-mediated lipid oxidation in washed minced horse mackerel muscle. Chelating compounds were added at 2 mmol/kg muscle. Lipid oxidation was triggered by adding 3 μ mol of pollock Hb/kg muscle and was monitored by following the PV, TBARS, and the loss of redness (a^* value) during incubation at 4 °C.

in decreasing order of efficiency by EDTA (Figure 4A). The formation rates of TBARS have also indicated lower propagation of lipid oxidation in fish muscle supplemented with STPP and EDTA. Citric acid and ATP were ineffective to prevent the formation of both lipid oxidation products, lipid peroxides, and TBARS. Regarding a potential influence of iron chelators on redox stability of hemoglobin, chelators used were not able to retard the rapid loss of redness observed between days 0 and 2. However, fish muscle supplemented with STPP and EDTA showed a significantly higher redness value than control samples at days 2 and 3 (Figure 4C).

Effect of Grape Proanthocyanidins on in Vitro Redox Stability of Fish Hemoglobin. The influence of proanthocyanidins on hemoglobin autooxidation rate was evaluated in vitro under hemoglobin/polyphenolic molar ratios similar to those found when pelagic fish muscle is supplemented with an effective concentration of grape proanthocyanidins (50 ppm or 57 μ mol/kg muscle). Horse mackerel was used as the hemoglobin source because it has a higher redox stability than pollock Hb (8); therefore, horse mackerel Hb was considered more adequate to distinguish potential protective/harmful effects of grape proanthocyanidins

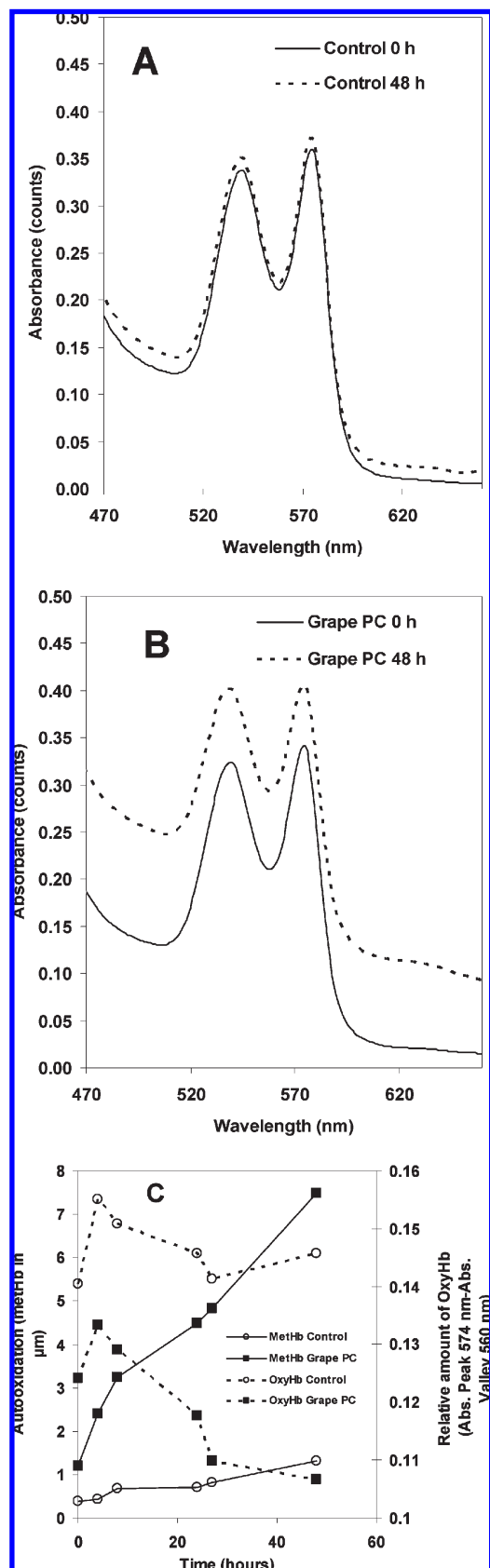


Figure 5. Spectral changes of horse mackerel Hb incubated in the absence (A) and the presence of grape proanthocyanidins (B) and effect of grape proanthocyanidins on metHb formation (C).

on hemoglobin redox stability. The results showed that control hemoglobin without polyphenolic supplementation suffered lower spectral changes during 48 h of incubation than hemoglobin

supplemented with grape proanthocyanidins (Figure 5A,B). The attenuation of the difference of absorbance between the peak at 570 nm and the valley at 540 nm observed in hemoglobin supplemented with proanthocyanidins is attributed to a reduction of oxygenated hemoglobin (OxyHb) levels, whereas the increment of absorbance at 630 nm denoted an important hemoglobin oxidation to metHb. In fact, grape proanthocyanidins were found to extensively accelerate the formation of metHb from approximately 1.0 to 7.5 μM after 48 h of incubation (Figure 5C). However, control hemoglobin without proanthocyanidins reached maximum values of metHb lower than 2.0 μM after the same incubation period.

DISCUSSION

There are several pathways by which the reductants here evaluated, not including catalase, may retard the propagation of hemoglobin-mediated lipid oxidation, such as free radical scavenging and deactivation of hypervalent ferryl Hb. Catalase could inhibit the pro-oxidant activity of hemoglobin through its recognized ability to decompose hydrogen peroxide, which may produce oxidizing ferryl Hb species by reaction with metHb (28). Regarding the free radical scavenging capacity through electron transfer to reactive free radical species, the FRAP (ferric ion reducing antioxidant parameter) estimates a donation of 3.2–6.0 electrons per molecule for grape proanthocyanidins with polymerization of 1.7–2.7 catechin units and galloylation percentages of 15–25% (7), which are similar to those used in our experiments. The FRAP value for ascorbic acid is two electrons per molecule (29). Our results certainly revealed a stronger efficiency of grape proanthocyanidins to inhibit lipid oxidation triggered by fish hemoglobin in both liposomes and washed fish muscle, in comparison with other reductants. Therefore, this higher antioxidant ability of grape proanthocyanidins is in accordance with their superior competence to scavenge free radicals via electron donation. In washed fish muscle, the three amino acid peptide GSH (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) was also active in retarding the pro-oxidant activity of hemoglobin, followed in decreasing order of efficiency by ascorbic acid and catalase, which exhibited similar antioxidant activity. GSH is provided of lower reducing capacity since it can donate only a single electron per molecule to reactive free radicals with the resultant formation of oxidized glutathione (GSSG), and its reduction potential [$E^\circ = 0.92 \text{ V}$ (30)] is notably higher than those of ascorbic acid [$E^\circ = 0.28 \text{ V}$ (30)] and galloylated/nongalloylated catechins [E° (epicatechin) = 0.56 V; E° (epigallocatechin gallate or EGCG) = 0.43 V (31)]. Consequently, the reducing hierarchy in terms of FRAP value or reduction potential suggests a superior inhibition of lipid oxidation by ascorbic acid than for GSH. However, it should be considered that ascorbic acid can exert pro-oxidant effects by decomposing lipid hydroperoxides to reactive aldehyde compounds (32). In fact, the presence of ascorbic acid caused a significant diminution of PV in washed fish muscle, but it was not effective to reduce TBARS formation.

Catalase exhibited low efficiency to prevent the development of hemoglobin-promoted lipid oxidation in liposomes and washed fish muscle. Gorelik and Kanner (33) have also reported the ineffectiveness of catalase, alone or combined with superoxide dismutase (SOD), to inhibit TBARS formation during the incubation of muscle membranes with oxyMb and ferrous ions. A relevant conclusion inferred of the reduced inhibitory activity by catalase should be the low contribution of hydrogen peroxide in the pro-oxidant mechanism of fish hemoglobin in both liposomes and washed fish muscle. This fact does not denote that the highly oxidizing ferryl Hb species are not implicated in

the pro-oxidative action of hemoglobin given that ferryl species can also be generated by the interaction of metHb with preformed lipid hydroperoxides (34). Additionally, the reaction of metHb with lipid hydroperoxides may have a greater pro-oxidant effect than the corresponding reaction with hydrogen peroxide considering the oxidizing power of additional reaction byproduct. The production of ferryl species via the hydrogen peroxide mediation generates water molecules as byproduct (3). In contrast, the interaction of metHb with lipid hydroperoxides induces hydroperoxide decomposition to form either free radical species (peroxyl, alkoxyl, alkyl, and hydroxyl) implicated in the radical chain reactions of lipid oxidation (10, 35) or reactive aldehyde products proficient to establish adducts with biomolecules (DNA and proteins) (36).

As a general tendency, iron chelators showed minor antioxidant activity on hemoglobin-mediated lipid oxidation than reductants or grape proanthocyanidins; therefore, chelating compounds were necessarily evaluated at much higher concentration. Concerning the chelating property of grape proanthocyanidins, a previous study has shown that 10 μ M analogous grape proanthocyanidins (mean polymerization, 1.7–2.7 units; polymerization percentage, 15–25%) are able to complex 7.0–12.3 μ M ferrous iron (7). EDTA holds major capacity to establish complexes with ferrous ions since 10 μ M EDTA is competent to chelate up to 12.9 μ M ferrous iron (result obtained in our laboratory). Taking into consideration that grape proanthocyanidins are notably more efficient to prevent hemoglobin-catalyzed lipid oxidation than EDTA, these data indicate a minor role of the chelating ability of grape polyphenols on their extensive antioxidant ability against hemoglobin-mediated lipid oxidation. Consequently, the reducing ability alone and/or combined with iron-chelating property is proposed to be a determinant to effectively prevent lipid oxidation promoted by fish hemoglobin. It is in accordance with previous studies that reported a significant correlation between the electron-donating capacity of different phenolic compounds and their ability to inhibit lipid oxidation in fillets and mince from horse mackerel, a dark-muscle fish species endowed with catalytic amounts of hemoglobin (37, 38). Moreover, the elevated antioxidant effect of wine phenolics in a lipid model system activated with myoglobin has been related with their capacity to reduce the catalytic ferrylMb species (39). More recent studies have demonstrated that EGCG and green tea extracts are highly effective in recycling ferryl back to metHb (40, 41).

The redness in washed fish muscle supplemented with fresh hemoglobin is essentially provided by the bright red color of oxyHb species, and therefore, hemoglobin oxidation to the brownish ferric metHb provokes loss of redness. Grape proanthocyanidins were effective to retard the loss of redness in washed fish muscle, and consequently, proanthocyanidins prevent hemoglobin against oxidation in fish muscle. These results contrast with those obtained in our in vitro experiments that revealed an increment of metHb formation in the presence of proanthocyanidins. Jia and Alayash (41) have also reported a faster oxidation of hemoglobin to metHb in the presence of EGCG, suggesting the implication of hydrogen peroxide (H_2O_2) as metHb formation was almost completely stopped by the addition of catalase and SOD. EGCG has the ability to produce superoxide radicals from molecular oxygen (42), and superoxide radicals can easily dismutated to hydrogen peroxide. Although similar Hb/proanthocyanidin ratios were employed in vitro and in washed fish muscle, the interaction between Hb and proanthocyanidins (or ROS generated from them) is probably stronger in vitro since Hb and grape polyphenols are the unique reactive components in the in vitro systems. However, the washed fish muscle is a more complex matrix, and consequently, polyphenols

(or ROS generated from them) can interact with majority components such as proteins and phospholipids.

To summarize, compounds bearing reducing abilities demonstrated higher antioxidant ability on hemoglobin-promoted lipid oxidation than iron chelators, suggesting that the free radical scavenging and/or reduction of ferrylHb species play a more important role to prevent the pro-oxidative action of hemoglobin than the iron chelation released from hemoglobin. The present paper also stresses the strong ability of grape proanthocyanidins to inhibit hemoglobin-catalyzed lipid oxidation, according with previous studies that indicated their effectiveness to prevent lipid oxidation in dark-muscle fish species (38, 43). Grape proanthocyanidins are proposed as an effective ingredient to stabilize health-promoting PUFAs in functional foods containing fish hemoglobin in catalytic amounts.

LITERATURE CITED

- (1) Hultin, H. O. Oxidation of lipids in seafoods. In *Seafoods. Chemistry, Processing, Technology and Quality*; Shahidi, F., Botta, J. R., Eds.; Blackie Academic and Professional: Suffolk, Great Britain, 1994; pp 49–74.
- (2) Mozuraityte, R.; Rustad, T.; Storror, I. The role of iron in peroxidation of polyunsaturated fatty acids in liposomes. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 537–543.
- (3) Kanner, J. Oxidative processes in meat and meat products quality implications. *Meat Sci.* **1994**, *36*, 169–189.
- (4) Venugopal, V.; Shahidi, F. Structure and composition of fish muscle. *Food Rev. Int.* **1996**, *12*, 175–197.
- (5) Richards, M. P.; Hultin, H. O. Contribution of blood and blood components to lipid oxidation in fish muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 555–564.
- (6) Pazos, M.; Medina, I.; Hultin, H. O. Effect of pH on hemoglobin-catalyzed lipid oxidation in cod muscle membranes in vitro and in situ. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3605–3612.
- (7) Pazos, M.; Lois, S.; Torres, J. L.; Medina, I. Inhibition of hemoglobin- and iron-promoted oxidation in fish microsomes by natural phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4417–4423.
- (8) Maestre, R.; Pazos, M.; Medina, I. Involvement of methemoglobin (methb) formation and hemin loss in the pro-oxidant activity of fish hemoglobins. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 7013–7021.
- (9) Undeland, I.; Hultin, H. O.; Richards, M. P. Added triacylglycerols do not hasten hemoglobin-mediated lipid oxidation in washed minced cod muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6847–6853.
- (10) Pazos, M.; Andersen, M. L.; Skibsted, L. H. Heme-mediated production of free radicals via preformed lipid hydroperoxide fragmentation. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11478–11484.
- (11) Grunwald, E. W.; Richards, M. P. Studies with myoglobin variants indicate that released hemin is the primary promoter of lipid oxidation in washed fish muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4452–4460.
- (12) O'Brien, P. J. Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide. I. Decomposition of a lipid peroxide by metal ions, heme compounds and nucleophiles. *Can. J. Biochem.* **1969**, *47*, 485–492.
- (13) Undeland, I.; Hultin, H. O.; Richards, M. P. Aqueous extracts from some muscles inhibit hemoglobin-mediated oxidation of cod muscle membrane lipids. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3111–3119.
- (14) Sannaveerappa, T.; Carlsson, N. G.; Sandberg, A. S.; Undeland, I. Antioxidative properties of press juice from herring (*Clupea harengus*) against hemoglobin (hb) mediated oxidation of washed cod mince. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9581–9591.
- (15) Lee, C.-H.; Krueger, C. G.; Reed, J. D.; Richards, M. P. Inhibition of hemoglobin-mediated lipid oxidation in washed fish muscle by cranberry components. *Food Chem.* **2006**, *99*, 591–599.
- (16) Sanchez-Alonso, I.; Borderias, J.; Larsson, K.; Undeland, I. Inhibition of hemoglobin-mediated oxidation of regular and lipid-fortified washed cod mince by a white grape dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5299–5305.
- (17) Torres, J. L.; Varela, B.; Garcia, M. T.; Carilla, J.; Matito, C.; Centelles, J. J.; Cascante, C.; Sort, X.; Bobet, R. Valorization of

- grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7548–7555.
- (18) Torres, J. L.; Lozano, C. Chromatographic characterization of proanthocyanidins after thiolysis with cysteamine. *Chromatographia* **2001**, *54*, 523–526.
- (19) Richards, M. P.; Hultin, H. O. Effect of pH on lipid oxidation using trout hemolysate as a catalyst: A possible role for deoxyhemoglobin. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3141–3147.
- (20) Brown, W. D. Chromatography of myoglobin on diethylaminoethyl cellulose columns. *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 2238–2240.
- (21) Medina, I.; Lois, S.; Lizarraga, D.; Pazos, M.; Tourino, S.; Cascante, M.; Torres, J. L. Functional fatty fish supplemented with grape procyanidins. Antioxidant and proapoptotic properties on colon cell lines. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3598–3603.
- (22) Winterbourn, C. C. Oxidative reaction of hemoglobin. In *Methods in Enzymology: Oxygen Radicals in Biological Systems*; Packer, L., Glazer, A. N., Eds.; Academic Press: London, 1990; Vol. 186, pp 265–272.
- (23) Huang, S. W.; Frankel, E. N. Antioxidant activity of tea catechins in different lipid systems. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3033–3038.
- (24) Frankel, E. N.; Huang, S. W.; Kanner, J.; German, B. J. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: Bulk oils vs emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1054–1059.
- (25) Chapman, R. A.; Mackay, K. The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1949**, *26*, 360–363.
- (26) Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in Enzymology: Biomembranes. Specialized Techniques*; Fleischer, S., Packer, L., Eds.; Academic Press: New York, 1978; Vol. 52, pp 302–310.
- (27) McDonald, R. E.; Hultin, H. O. Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle. *J. Food Sci.* **1987**, *52*, 15–21.
- (28) Kanner, J.; Harel, S. Initiation of membranous lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *237*, 314–321.
- (29) Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76.
- (30) Buettner, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *300*, 535–543.
- (31) Jovanovic, S. V.; Hara, Y.; Steenken, S.; Simic, M. G. Antioxidant potential of gallic catechins. A pulse radiolysis and laser photolysis study. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9881–9888.
- (32) Seon Hwa, L.; Oe, T.; Blair, I. A. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science* **2001**, *292*, 2083–2086.
- (33) Gorelik, S.; Kanner, J. Oxymyoglobin oxidation and membrane lipid peroxidation initiated by iron redox cycle: Preservation of oxidation by enzymic and nonenzymic antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5945–5950.
- (34) Reeder, B. J.; Wilson, M. T. Mechanism of reaction of myoglobin with the lipid hydroperoxide hydroperoxyoctadecadienoic acid. *Biochem. J.* **1998**, *330*, 1317–1323.
- (35) Davies, M. J. Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with heme-proteins by electron-spin resonance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *964*, 28–35.
- (36) Hayashi, T.; Uchida, K.; Takebe, G.; Takahashi, K. Rapid formation of 4-hydroxy-2-nonenal, malondialdehyde, and phosphatidylcholine aldehyde from phospholipid hydroperoxide by heme-proteins. *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *36*, 1025–1033.
- (37) Medina, I.; Gallardo, J. M.; Gonzalez, M. J.; Lois, S.; Hedges, N. Effect of molecular structure of phenolic families as hydroxycinnamic acids and catechins on their antioxidant effectiveness in minced fish muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3889–3895.
- (38) Pazos, M.; Alonso, A.; Fernández-Bolaños, J.; Torres, J. L.; Medina, I. Physicochemical properties of natural phenolics from grapes and olive oil by-products and their antioxidant activity in frozen horse mackerel fillets. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 366–373.
- (39) Kanner, J.; Frankel, E.; Granit, R.; German, B.; Kinsella, J. E. Natural antioxidants in grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 64–69.
- (40) Hu, M.; Skibsted, L. H. Kinetics of reduction of ferrylmyoglobin by (–)-epigallocatechin gallate and green tea extract. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2998–3003.
- (41) Jia, Y.; Alayash, A. I. Effects of (–)-epigallocatechin gallate on the redox reactions of human hemoglobin. *Free Radical Biol. Med.* **2008**, *45*, 659–666.
- (42) Kondo, K.; Kurihara, M.; Miyata, N.; Suzuki, T.; Toyoda, M. Scavenging mechanisms of (–)-epigallocatechin gallate and (–)-epicatechin gallate on peroxy radicals and formation of superoxide during the inhibitory action. *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *27*, 855–863.
- (43) Pazos, M.; Gallardo, J. M.; Torres, J. L.; Medina, I. Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chem.* **2005**, *92*, 547–557.

Received May 22, 2009. Revised manuscript received August 10, 2009. Accepted August 24, 2009. This investigation has been supported by the Spanish Ministry of Science (Grant AGL2006-12210-C03-01). The Spanish Ministry of Science is also gratefully acknowledged by a doctoral fellowship to R.M. CSIC is grateful for a doctoral fellowship to J.I. and a postdoctoral-JAE contract to M.P.

CAPÍTULO 2

**INCORPORACIÓN E INTERACCIÓN DE POLIFENOLES
NATURALES EN MEMBRANAS Y SU RELACIÓN CON
LA EFICACIA ANTIOXIDANTE EN ALIMENTOS
COMPUESTOS POR MÚSCULO DE PESCADO.**

2. INCORPORACIÓN E INTERACCIÓN DE POLIFENOLES NATURALES EN MEMBRANAS Y SU RELACIÓN CON LA EFICACIA ANTIOXIDANTE EN ALIMENTOS COMPUESTOS POR MÚSCULO DE PESCADO.

2.1 Introducción

La alta susceptibilidad del pescado a desarrollar oxidación lipídica se debe en gran medida a su elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados. Existen evidencias de que las membranas celulares son los sustratos primarios donde se inicia la reacción de oxidación (43). Este hecho puede atribuirse al mayor grado de insaturación de los fosfolípidos, comparado con el de los triglicéridos, al gran área superficial que poseen (152) y a que están en contacto con compuestos prooxidantes.

El uso de antioxidantes procedentes de residuos agroforestales ha proporcionado excelentes resultados inhibiendo la oxidación lipídica en diferentes alimentos (178, 212, 213). Los atributos antioxidantes que pueden ejercer los compuestos fenólicos son, entre otros, su capacidad para quelatar metales, su capacidad reductora y su capacidad antirradicalaria. Medina et al (214) observaron en músculo de jurel refrigerado que la capacidad reductora es la propiedad antioxidante que juega un papel más importante en compuestos de la familia de los ácidos hidroxycinámicos. También se ha encontrado correlación entre la capacidad reductora de distintas catequinas y su actividad antioxidante en filetes congelados de jurel (215). Además, se ha demostrado que la actividad antioxidante de extractos fenólicos de uva no se ve afectada por cambios físico-químicos del medio como pH, contenido en sal o humedad de la muestra (216). A su vez, está bien establecido que las medidas *in vitro* de las distintas propiedades antioxidantes no siempre reflejan la actividad encontrada en alimentos, y que factores como la distribución o la localización también son importantes (217).

Se ha mostrado que la actividad antioxidante de distintos extractos de uva compuestos por polifenoles está más relacionada con el coeficiente de partición aceite-agua que con la actividad redox del extracto (178). Se observó que la efectividad antioxidante de diferentes fenoles naturales estaba correlacionada con su afinidad a incorporarse dentro de microsomas de pescado (153). También se ha sugerido que la alta eficacia antioxidante de ciertas catequinas galoizadas, como el EGCG, es debida a la formación de estructuras resistentes a la solubilización por detergentes (151), y a que el compuesto antioxidante se encuentra intercalado entre las cadenas acílicas, lugar donde se cree que se inicia la oxidación lipídica (43, 44). Por tanto, la capacidad de un

compuesto o extracto para inhibir la oxidación lipídica viene también determinada por su incorporación e interacción con el sustrato oxidable, así como por sus propiedades químicas antioxidantes.

El objetivo de esta parte de la tesis fue el estudio del efecto en la actividad antioxidante de la incorporación e interacción del extracto de semilla de uva rico en procianidinas utilizado en esta tesis doctoral, así como de sus principales componentes, en las membranas biológicas. Para ello, a través de la aplicación de espectroscopía de fluorescencia, dispersión de luz y calorimetría diferencial de barrido se determinó la localización y la modificación de la estructura de distintos modelos de membrana producida por los polifenoles. La capacidad reductora, quelatante y antirradicalaria del extracto de uva y de sus principales componentes también fue estudiada con el objetivo de determinar sus propiedades antioxidantes *in vitro*. Todos los resultados obtenidos fueron correlacionados con la inhibición de la oxidación lipídica provocada por cada antioxidante en un sistema de músculo picado de caballa (*Scomber scombrus*).

2.2 PUBLICACIÓN

Incorporation and Interaction of Grape Seed Extract in Membranes and Relation with Efficacy in Muscle Foods

Rodrigo Maestre, Vicente Micol, Lorena Funes and Isabel Medina

J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 8365-8374

Incorporation and Interaction of Grape Seed Extract in Membranes and Relation with Efficacy in Muscle Foods

RODRIGO MAESTRE,^{*,†} VICENTE MICOL,^{†,‡} LORENA FUNES,^{†,‡} AND ISABEL MEDINA[†][†]Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Eduardo Cabello 6, E-36208 Vigo, Spain, and[‡]Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández de Elche, Avenida de la Universidad s/n, E-03202 Elche, Alicante, Spain

The interaction and location of phenolic antioxidants in model membranes has been related with their effectiveness for inhibiting lipid oxidation of fish mince with the aim to identify mechanisms involved in the antioxidant effectiveness in muscle foods. For such scope, the effect of grape seed extract and its main components, catechin, epicatechin and procyanidin B₂ to be located and induce changes in phospholipid model membranes was studied by different biophysical techniques and related to their antioxidant efficiency. Grape seed extract showed the highest inhibition of oxidation in chilled minced fish muscle. Antioxidant in- vitro capacities were also studied but they did not show a clear relationship with the antioxidant efficiency found in fish muscle. The phospholipid/water partition coefficients and fluorescence quenching studies showed that procyanidin B₂ was located in a more internal location than monomeric catechin and epicatechin within the phospholipid palisade. Grape seed extract showed strongest effect compared to its main components in the increase of the lipid order at the DMPC fluid phase by fluorescence anisotropy measurements. Grape seed extract also promoted a dehydration effect in DMPC membranes at the phospholipid/water interface and resistance to solubilization by nonionic detergents in DMPC membranes. The presence of molecular linkages, probably by hydrogen bonding, is proposed between procyanidins (or some galloylated catechins) and the polar head groups of the phospholipids to account for the dehydration effect at the phospholipid/water interface and membrane-stabilizing effects. These effects may be directly related to the higher efficacy of grape seed extract to inhibit lipid oxidation in fish muscle, probably by hindering radical propagation.

KEYWORDS: Catechins; procyanidin B₂; grape extract; lipid oxidation; membranes; phospholipid vesicles

INTRODUCTION

Fish are rich in essential ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as eicosapentanoic acid (20:5 ω -3) and docosahexanoic acid (22:6 ω -3). These acids have shown potential benefits for human health (1, 2). However, the presence of these unsaturated lipids and large amounts of heme pigments and metallic traces on fish muscle and tissues contributes to the susceptibility of fish lipids to suffer oxidation. Once the oxidative reaction has been initiated, the hydroperoxides formed are converted to free radicals and finally to the volatiles that are the responsible for the development of rancid off-flavors. The oxidation products formed react with other muscle components as proteins, amino acids, or vitamins, leading to changes in color or texture (3). All these reactions lead to a loss of the organoleptic and nutritional attributes and limits the storage and processing of fish species, especially those having high PUFA concentrations. Fish rancidity cannot be totally avoided but different procedures have been proposed to delay the oxidative process and inhibit the apparition

of the first hydroperoxides or volatiles. Washing with water or the use of brine immersion or glazing can retard lipid oxidation in fatty fish (4). The use of slurry ice, vacuum packaging, or the application of oxygen absorbers have been proposed by the fish product industry to control lipid oxidation (5–7).

In the last years, the use of natural antioxidants becomes an emergent methodology for controlling lipid oxidation and its deleterious repercussions (8–10). Nowadays, the addition of natural antioxidant extracts to foods is a common practice in industry. The use of polyphenols coming from agricultural and forestry byproduct provides excellent extracts that fulfill this objective. Grape flavonoids have shown to act as powerful antioxidants by scavenging free radicals and terminating oxidative reactions (11). Different authors have successfully tested grape seed and pomace extracts as food ingredients in different lipid systems and foodstuffs as vegetable and fish oils, beef, turkey, and chicken meat or fish muscle (9, 12–14). The efficiency found in these studies was highly dependent on the type of food muscle system. Some of these studies have demonstrated the ability of the grape seed extracts for inhibiting oxidation during long-term food storage. In addition, Branan et al (15) have

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: maestre@iim.csic.es. Telephone +34 986 231930. Fax +34 986 292762.

demonstrated that the antioxidant activity of grape seed extracts does not seem to be affected by changes in the physicochemical conditions of food as variations in the moisture content or pH during storage. These works have also shown different grades of efficacy depending on the physical state of the lipids or oils. Some polar grape extracts were not very effective for bulk fish oils but were effective for minced fish muscle (9). The antioxidant action can progress through different routes that include, among others, the capacity for chelating metals, the redox capacity of the antioxidant and the free radicals scavenging ability. It is well established that the *in vitro* measures of these antioxidant properties do not always reflect the activity found in real foods (16). The physical interactions and the incorporation of the antioxidant into the oxidative sensitive sites of the system seem to be significant parameters involved in the antioxidant efficacy as well (17).

The high oxidative susceptibility of fish muscle has been traditionally attributed to the total lipid content (18). However, there is some evidence that phospholipids (PL), which give structure and fluidity to membranes, are the primary lipid substrate for lipid oxidation in muscle food, whereas triglycylglycerols play a minor role (19). This could be attributed to their PL high degree of unsaturation, the close contact of membranes with catalysts of lipid oxidation located in the aqueous phase of muscle cells, and their large surface area (20). PUFAs are highly concentrated in PL, which content is more or less constant in fish muscle (0.5–1.0%). Few studies published during the last years have tried to explain the antioxidant mechanism of action of polyphenols based on their localization and affinity for lipid bilayers (21–23). Plant phenolics and tocopherol have demonstrated to perturb the phase behavior of the lipid bilayers and have a fluidifying effect that could favor the known antioxidant capability and scavenging characteristics of these compounds (24). Gallate catechins have also demonstrated a high affinity for lipid bilayers resulting in a perturbation of the membrane structure (22). Additionally recent works have stressed the interactions of catechins with lipid bilayers of cell membranes establishing different mechanisms of interaction and as consequence different biological *in vivo* activities (25). Phenolic antioxidants having the highest affinity for membranes have also resulted the most effective antioxidants for inhibiting oxidation of fish microsomes (26).

Considering the above-mentioned, the aim of this work was to evaluate the relation of the interaction and location of antioxidants in model membranes with their effectiveness for inhibiting lipid oxidation of minced fish muscle. For such scope, different antioxidants as grape seed extract and its main components (catechin, epicatechin, and procyanidin B₂), which show differences in their molecular structure and therefore in their physicochemical interactions with membranes, were selected. In addition, the scavenging, reductant, and chelating capacities of these components were also determined to check the main parameters influencing the antioxidant efficacy found in the fish minced muscle model. The localization, affinity, and effects of the antioxidants selected on the lipid order and hydration state of membranes were studied by fluorescence spectroscopy. Then, these effects were related to the antioxidant effectiveness of these compounds to explain their inhibitory effect on fish lipid oxidation. Finally, the antioxidant *in vitro* capacity of the grape seed extract and its main components was determined by their reducing ability and chelating and radical scavenging capacities. This study attempts to contribute to a better knowledge of the antioxidant mechanism attributed to natural phenolics in muscle tissues.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Synthetic lipids 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) were obtained from Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL).

Stock solutions were prepared in chloroform/methanol (1:1) and stored at –20 °C. EDTA, (–)-epicatechin, (+)-catechin, procyanidin B₂, FeCl₂·4H₂O, sodium acetate trihydrate, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric sulphate, streptomycin sulfate salt, ferrozine, FeCl₃·6H₂O, L-histidine and potassium chloride (KCl), ammonium heptamolybdate tetrahydrate, perchloric acid potassium hydrogen phosphate, L-ascorbic acid, HEPES, and sodium chloride (NaCl) were purchased from Sigma (Steinheim, Germany). The fluorescent probes 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) and 1-(4-trimethylammonium phenyl)-6-phenyl-1,3,5 hexatriene (TMA-DPH), spin labels 5-doxy-stearic acid (5-NS) and 16-doxy-stearic acid (16-NS), and 6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene (Laurdan) were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). Stock solutions of DPH probes and Laurdan were prepared in *N,N'*-dimethyl formamide (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). 2,4,6-Tri-(2-pyridyl)-s-triazine was obtained from Fluka (New-Ulm, Switzerland). All solvents and chemicals used were either analytical or high-performance liquid chromatography grade (Ridel-Haën, Seelze, Germany).

Grape Proanthocyanidins. A grape fraction rich in oligomeric catechins (proanthocyanidins) was prepared by fractionation of a commercial grape seed extract (Le Grandonnet, Cruviers-Lascours, France) that contained 40% of proanthocyanidins. Fractionation was performed by size exclusion chromatography based on Toyopearl resin as previously described in Torres et al. (27). Briefly, the commercial extract containing mainly flavanol (catechin) monomers, flavanol oligomers (procyanidins), and monomeric-glycosylated flavonols was separated by chromatography on Toyopearl. A set of fractions differing in size, monomers from oligomers, was obtained. Each grape fraction was characterized in terms of mean molecular weight, mean polymerization degree, and percentage of galloylation (presence of esters with galloyl moieties) by depolymerization with cysteamine according with Torres and Lozano (28). An individual fraction having mean molecular weight of 760 g/mol, polymerization degree of 2.4 units, and galloylation percentage of 15% was selected. The major components expressed in molar percentage were catechin (29.56%), of epicatechin (29.09%) and procyanidin B₂ (7.38%).

Phospholipid Vesicle Preparation. Aliquots containing the appropriate amount of lipid in chloroform/methanol (1:1, v/v) and antioxidants were placed in a test tube, the solvents removed by evaporation under a stream of O₂-free nitrogen, and finally traces of solvents were eliminated under vacuum for >3 h. The lipid films were resuspended in buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) and incubated either 25 or 10 °C above to gel-to-liquid crystalline phase transition temperature (T_m) with intermittent vortexing for 30 min to hydrate the samples and obtain multilamellar vesicles (MLVs). The samples were frozen and thawed five times to ensure complete homogenization and maximization of antioxidants/lipid contact with occasional vortexing. Large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared by the extrusion method (29), using polycarbonate filters with a pore size of 0.2 μm (Nucleopore Corp, Cambridge, CA). The phospholipid concentration was measured by the method of Böttcher et al. (30).

Determination of the Partition Coefficient. The phospholipid/water partition coefficient, which accounts for the percentage of antioxidant molecules bound to membranes, was measured using the Nernst partition coefficient described by (31)

$$K_p = \frac{n_l}{\frac{V_l}{n_w} V_w}$$

where n_i stands for moles of compound in phase i and V_i for volume of phase i ; the phase was either aqueous ($i = w$) or lipidic ($i = L$). The quantitation of K_p was determined from the intrinsic fluorescence intensity increase of the compound upon the incorporation into LUVs composed of DMPC as compared to that in the aqueous phase, according to (32)

$$\Delta I = \frac{\Delta I_{\max} [L]}{1/K_p \gamma + [L]}$$

Fluorescence Quenching Experiments. Differential quenching data using 5-NS and 16-NS were analyzed by the Stern–Volmer plot of I_0/I versus $[Q]_L$, where I_0 and I stand for the fluorescence intensities of the catechins in the absence and in the presence of the quencher, respectively,

and $[Q]_L$ is the quencher concentration in the phospholipid phase given by (4)

$$[Q]_L = \frac{K_{PQ} V_T}{V_w + V_L K_{PQ}} [Q]_T$$

where

$$K_{PQ} = \frac{[Q]_L}{[Q]_w}$$

is the partition coefficient of the quencher between the phospholipid phase and the aqueous phase, $[Q]_T$ is the concentration of the quencher in the total volume V_T ($V_T = V_L + V_w$), and V_L and V_w are, respectively, the volume of the lipid and aqueous phases. For 5-NS and 16-NS, K_{PQ} in the fluid phase is 89 000 and 9730, respectively (33). Experiments were carried out in LUVs of DMPC containing different catechins at 30 °C at lipid-saturating conditions of the resulting curves of the partition experiments, by adding aliquots from a 1 mM solution containing either the 16-NS or 5-NS spin probes in ethanol to the vesicle suspensions. Measurements were taken immediately after preparation.

The hydrophilic quencher acrylamide was used to study the presence of catechin molecules accessible to the aqueous phase and to confirm the possible location of catechins in phospholipid model membranes. LUVs composed of DMPC were incubated with the appropriate amounts of catechins for 30 min at 30 °C before the quenching experiments. Then, quenching of catechins was performed in the absence and in the presence of DMPC vesicles, at lipid-saturating conditions, by adding acrylamide from a 4 M acrylamide/water solution to the catechin/vesicles or catechin/buffer suspensions.

Differential Scanning Calorimetry. The preparation of the samples for the calorimetric measurements was performed as previously described for MLVs vesicles. Afterward, the samples were centrifuged and the pellets containing lipid vesicles were transferred to 50 μ L DSC aluminum and hermetically sealed pans and subjected to DSC analysis in a differential scanning calorimeter Pyris 6 DSC (Perkin-Elmer Instruments, Shelton, CT). The heat capacity was obtained raising the temperature at a constant rate of 1 °C/min over the range from 8 to 37 °C. A series of three consecutive scans of the same sample were performed to ensure scan-to-scan reproducibility. The second scan was used for transition calculations. After thermal measurements, the phospholipid content of the sample was determined (34). For thermal analysis, data acquisition was performed using the Pyris Software, version 4.0 (Perkin-Elmer Instruments LLC). Microcal Origin software (Microcal Software Inc., Northampton, MA) was used for data analysis.

Steady-State Fluorescence Anisotropy Measurements. The changes in the phospholipids order of model membranes were measured by using two probes located at different depths into the membrane, TMA-DPH and DPH. DMPC model membranes containing different catechins or procyanidin-B₂ concentrations were prepared as previously described for MLVs vesicles. To minimize the scattering of the samples, the phospholipid concentration was kept at 0.5 mM. Aliquots of TMA-DPH or DPH in *N,N'*-dimethylformamide were added into the lipid dispersion to obtain a probe/lipid molar ratio of 1/500. Different times of incubation were used for the spin probes according to their location. Samples were incubated for 15 or 90 min at 30 °C when TMA-DPH or DPH were used, respectively. All fluorescence studies were carried using 5 \times 5 mm quartz cuvettes in a final volume of 400 μ L.

The steady state fluorescence anisotropy, $\langle r \rangle$, of TMA-DPH or DPH was measured with an automated polarization accessory using a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrometer, coupled to a Peltier device (Varian) for automatic temperature change. The vertically and horizontally polarized emission intensities, elicited by vertically polarized excitation, were corrected for background scattering by subtracting the corresponding polarized intensities of a phospholipid preparation lacking probes. The G-factor, accounting for differential polarization sensitivity, was determined by measuring the polarized components of the fluorescence of the probe with horizontally polarized excitation ($G = I_{HV}/I_{HH}$). Samples were excited at 360 nm (slit width, 5 nm) and fluorescence emission was recorded at 430 nm (slit width, 5 nm). The steady-state anisotropy was defined by the equation

$$\langle r \rangle = \frac{(I_{VV} - GI_{VH})}{(I_{VV} + 2GI_{VH})}$$

where I_{VV} and I_{VH} are the measured fluorescence intensities (after appropriate background subtraction) with the excitation polarizer vertically oriented and the emission polarizer vertically and horizontally oriented, respectively.

Laurdan Polarization. The steady-state generalized polarization of the fluorescent probe Laurdan has specific values for the gel and liquid crystalline phases of phospholipids and it is independent of the phospholipid polar head, acyl chain composition, or pH ranging from 4 to 10 (35). This parameter relies on the spectral shifts that this probe undergo depending on the chromophores surrounding polarity and solvent dynamics (35). Excitation generalized polarization (GP_{ex}) values are given by

$$GP_{ex} = (I_{440} - I_{480}) / (I_{440} + I_{480})$$

where I_{440} and I_{480} are the fluorescence intensities at 440 and 480 nm, respectively, after excitation at 380 nm.

For these experiments DMPC multilamellar vesicles (MLVs) model membranes containing different molar ratios of the antioxidant compounds were used. Aliquots of Laurdan were directly added into the lipid dispersion to obtain probe/lipid molar ratio of 1:500. Samples with probes were incubated for 15 min above the gel-to-liquid crystalline phase transition temperature (30 °C) and measurements were taken immediately after. GP_{ex} measurements were recorded at temperatures below and above the phospholipid temperature transition at 15 and 37 °C.

Light Scattering Measurements. MLVs composed of DMPC and containing grape seed extract or pure compounds were prepared. For measuring the membrane solubilization capacity upon detergent addition, the optical density of a 0.95 mM phospholipid dispersion with or without antioxidant was registered at 400 nm using the same buffer as described in the DSC experiments at 25 °C (POLAR star Galaxy, BMG). After the addition of Triton X-100 to a final concentration of 0.25% (w/v), the optical density was measured with continuous mixing.

Reducing Power of the Phenolic Compounds. FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power) method was used by adaptation of the procedure of Benzie and Strain (36) adapted by Pazos et al. (24). The FRAP reagent was prepared daily by mixing acetate buffer 300 mM (pH 3.6), TPTZ 10 mM, and ferric chloride 20 mM in the ratio 10:1:1, respectively. TPTZ solution was prepared in HCl 40 mM. A sample of 1.5 mL of FRAP reagent was incubated for 10 min at 37 °C. Then, 150 μ L of water and 50 μ L of phenolic solution (0.2–4 mg/L) were added and the absorbance was measured at 593 nm after 4 min. The standard curve was built with ferrous chloride. The results were expressed as micromoles Fe reduced per micromoles antioxidant.

Chelating Capacity of the Phenolic Compounds. The capacity of the phenols for chelating ferrous iron was determined using an adaptation of the procedure by Kolayli et al. (37). A total of 0.2 mL of phenolic solution (4–400 mg/L) was mixed with 1.2 mL of 0.12 M KCl, 5 mM L-histidine solution (pH 6.8), and 0.2 mL of 0.2 mM ferrous chloride. Then, 0.4 mL of 1 mM ferrozine was added, and the samples were incubated at room temperature for 10 min. Then, the absorbance at 560 nm was measured, and the chelating capacity was calculated according to the following equation

$$\text{Chelating (\%)} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$$

where A_0 represents the absorbance of the blank without phenolic compounds, A_1 represents the absorbance of the sample with phenolic compound, and A_2 is the absorbance of the blank composed by phenolic compound and the ferrous iron, which removes the interferences generated by phenol-Fe(II) complex. EDTA was employed as a standard.

Determination of Scavenging Capacity (DPPH Radical Scavenging Method). The antioxidant activity of the different polyphenols used was measured in terms of hydrogen-donating or radical-scavenging ability using the stable radical DPPH (38) according to the procedure by Von Gadov et al. (39). For each antioxidant, different concentrations were tested (expressed as the number of moles of antioxidant/mol DPPH). Antioxidant solution in methanol (0.1 mL) was added to 3.9 mL of a 6×10^{-5} mol/L methanol DPPH e solution. The decrease in absorbance was determined at 515 nm at 15 min. The exact initial DPPH* concentration (C_{DPPH}) in the reaction medium was calculated from a calibration curve with the equation $\text{Abs}_{515\text{nm}} = 12\,509 \times (C_{DPPH}) - 2.58 \times 10^{-3}$ as determined by linear regression.

Antiradical activity was defined as the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50%.

Chilled Minced Mackerel. Fish were purchased in a local market. Fish was deboned and eviscerated and the white muscle with no skin was separated. The muscle was chopped with a grinder machine to get ground fish muscle. Streptomycin sulfate (200 ppm) was added for inhibiting microbial growth. The different antioxidant compounds were added as a powder at a concentration of $65.7 \mu\text{mol/kg}$ of minced muscle. Control samples were prepared with no addition of antioxidants. Portions of 6 g of minced muscle were stored at 4°C . Triplicate samples were taken at different sampling times.

Lipid Extraction. Lipid was extracted from fish muscle according to Bligh and Dyer (40) and quantified gravimetrically (41).

Peroxide Value. The peroxide value of fish muscle was determined by the ferric thiocyanate method (42) and was expressed as mequiv oxygen/kg lipid. Analyses were performed in triplicate.

Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS). The thiobarbituric acid index (mg malondialdehyde/kg muscle) was determined according to Vyncke (43). Analyses were performed in triplicate.

Sensory Analysis. Sensory analysis was evaluated by an expert panel formed by four trained specialists in descriptive analysis of fishy off-flavors in a room designed for the purpose. The group formed by two women (thirty-five years old) and two men (sixty and thirty-six years old) trained for 10 years in descriptive analysis of fishy off-flavors sniffed the raw samples that were used for chemical determinations. Approximately 10 g of muscle was placed in separate sterile polystyrene Petri dishes and placed at room temperature during 10 min before analysis. Panelists concentrated on detecting rancidity/painty odors using a hedonic scale from 8 to 1, where 8 was the aroma of absolutely fresh and 1 was a putrid aroma (4). The odor scores were 8, fresh seaweedy; 7, low odor; 6, stale, earthy; 5, sour, fishy, rotting orange; 4, slight paint; 3, moderate paint; 2, strong paint; and 1, putrid/ammonia.

Statistical Analysis. Each sample type (antioxidant) was replicated in two independent storage experiments ($n = 2$) using different batches of mackerel. The samples were analyzed in triplicate. Assays were carried out on single bags for each formulation. An average value of the replicate analyses was used in calculations of sample variation and significance testing. One-way analysis of variance (ANOVA) was done as a function of antioxidant and storage time (44). Then, per each treatment one-way ANOVA has been performed as a function of time, and per each storage time one way ANOVA was done as a function of treatment. Values are presented as means \pm standard deviations (SD). Statistical analyses were performed with the software Statistica 6.0.

RESULTS

Partition Coefficients of Pure Compounds in Model Membranes.

Emission spectra of pure compounds were much more intense in methanol and in membranes than in water most likely due to its higher quantum yield in these solvents. The fact that the compounds studied showed stronger fluorescence emission properties in methanol solutions, which environment shows similar polarity to the membrane surroundings, facilitated the study of the interaction of these compounds with model membranes. The measurement of the phospholipid/water partition coefficient value (K_P) in phospholipid membranes of DMPC showed that procyanidin B₂ had the highest partition coefficient with a value of $(2.490 \pm 0.370) \times 10^3$ followed by epicatechin with a K_P value of $(9.60 \pm 1.10) \times 10^2$ and catechin with a value of $(5.70 \pm 0.90) \times 10^2$. This result indicates that procyanidin B₂, and probably other dimeric procyanidins, present stronger interaction with phospholipid membranes than their respective monomeric forms.

Localization of Procyanidins and Monomeric Catechins in Model Membranes. Fluorescence-Quenching Experiments. The penetration of the different compounds into the lipid bilayer was determined by monitoring the relative quenching of the fluorescence of the molecules incorporated into the fluid phase of DMPC by the lipophilic spin probes 5-NS and 16-NS. These spin probes are fatty acids differing in the position of a nitroxide group into the

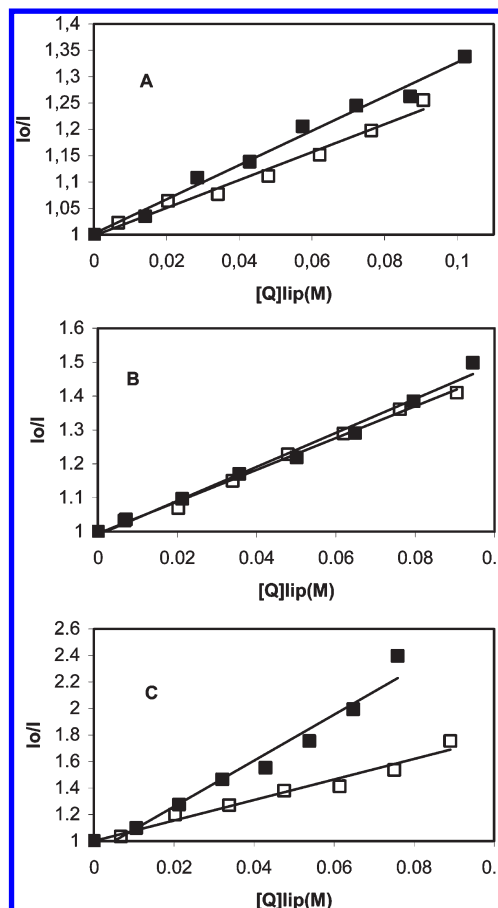


Figure 1. Stern–Volmer quenching plots of (A) catechin, (B) epicatechin, and (C) procyanidin B₂ by 5-NS (■) and 16-NS (□) incorporated into lipid vesicles of DMPC at 30°C .

molecule. The nitroxide group is located at 5C for the spin probe 5-NS and is located at 16C for spin probe 16-NS, respectively. The intrinsic fluorescence of the different compounds decreased upon the addition of the nitroxide quenchers. The Stern–Volmer plots (Figure 1) show how the compounds were quenched by the two probes located at different depths in the bilayer, that is, 5-NS and 16-NS. The results show that quenching of catechin (Figure 1A) and epicatechin (Figure 1B) was quite similar by the two spin probes regardless of the position of the nitroxide group, showing a low level of quenching in both cases. In contrast, procyanidin B₂ fluorescence was quenched in a higher degree by 5-NS spin probe compared to 16-NS (Figure 1C).

The Stern–Volmer constants were obtained from the respective plot slopes. The ratio of the Stern–Volmer constants for probes 5-NS and 16-NS ($K_{SV(5-NS)}/K_{SV(16-NS)}$) indicates the relative quenching between 5-NS and 16-NS probes. This ratio was found to be approximately 1 for catechin and epicatechin (Figure 1A,B) and 2.24 for dimer-B₂ (Figure 1C). These results indicate a superficial location for catechin and epicatechin since both compounds were poorly quenched by the two spin probes. Procyanidin B₂ was efficiently quenched by 5-NS probe that reveals a position of its fluorophore group very close to the C5 region.

To confirm the position of the antioxidant compounds into the lipid bilayer, the hydrophilic quencher acrylamide was used. Acrylamide can be used as a quencher to determine fluorophores located at superficial positions or outside the membrane. It can provoke a decrease in the fluorescence intensity of the antioxidant determining the relative position of the antioxidant, inside or outside the membrane. Figure 2A–C shows the acrylamide quenching plots for

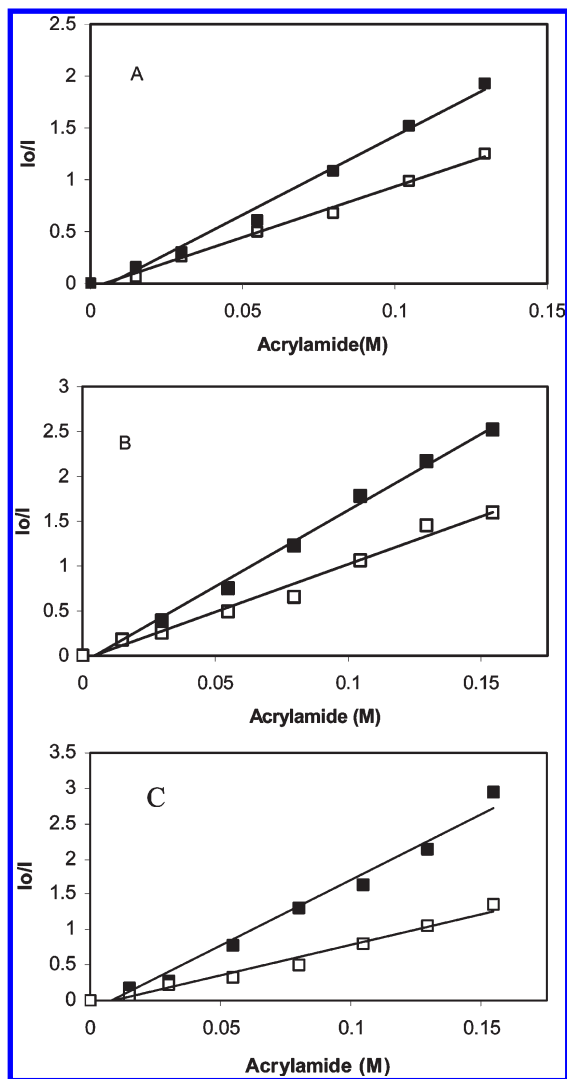


Figure 2. Stern–Volmer quenching plots of (A) catechin, (B) epicatechin, and (C) procyanidin B₂ by acrylamide in buffer (■) or incorporated into lipid vesicles of DMPC (□) at 30 °C.

catechin, epicatechin, and procyanidin B₂, respectively. The Stern–Volmer constants were used to confirm the location of the antioxidant compounds. The value of the ratio $K_{SV \text{ LIPID VESICLES}}/K_{SV \text{ BUFFER}}$ for procyanidin-B₂ was 2.14, while for catechin and epicatechin the values were close to 1.5. These results indicate that procyanidin B₂ was much more efficiently quenched by acrylamide when it was dissolved in a buffer than when it was in presence of DMPC vesicles. Such results evidenced a major proportion of procyanidin B₂ inside the membrane where it cannot be quenched by acrylamide than catechin and epicatechin.

Effect of the Monomeric Catechins and Procyanidin on the Thermotropic Behavior of Model Membranes Composed of Phosphatidylcholine. The thermotropic effects of the pure compounds and the grape seed extract in phospholipid membranes were studied by DSC. The phospholipid DMPC was used to test the effect of increasing amounts of the antioxidant compounds on the main gel-to-liquid crystalline phase transition.

The incorporation of increasing amounts of catechin and epicatechin, showed a similar effect on the thermotropic behavior of DMPC vesicles, that is, the elimination of the pretransition at low percentages (2%) and gradual broadening and shifting of the main transition to lower temperatures when the concentration was increased up to 10 molar % (Figure 3A,B). Procyanidin B₂ had a weaker effect on the broadening and shifting of the main transition

of DMPC than that observed for the monomeric catechins (Figure 3C). The addition of grape seed extract to DMPC vesicles (Figure 3D) showed a similar effect to that observed for catechin and epicatechin. Considering the lower concentrations of procyanidin B₂ in the grape seed extract compared with those of catechin and epicatechin, it can be assumed that the contribution of the procyanidin B₂ to the thermotropic effect of grape seed extract in PC membranes was low.

Lipid/Water Interface Hydration Evaluation through Laurdan Fluorescence Measurements. It has been shown that Laurdan fluorescence spectrum is sensitive to the polarity or hydration state of the lipid/water interface as well as to water molecules dynamics surrounding Laurdan's chromophore (45, 46). Laurdan molecule is strongly anchored in the hydrophobic core of the bilayer due to hydrophobic interactions between its lauric acid tail and the lipid alkyl tails while its fluorescence moiety is located at the glycerol level of the phospholipid head groups. The spectral changes in the emission spectra of Laurdan can be characterized by the generalized emission polarization value (GPex). It has been shown that the GPex value decreased when water penetration into the bilayer increases and this is due to the red shift of Laurdan fluorescence spectrum caused by dipole–dipole interactions and reorientation of available water molecules in the vicinity of the Laurdan probe in the bilayer.

Figure 4 shows the value of GPex determined in phospholipid dispersion containing increasing concentrations of the antioxidant compounds (extract and pure compounds). A slight increase of GPex values was observed when DMPC dispersion contained increasing concentrations of procyanidin B₂ or catechin in the liquid crystalline state at 37 °C. Epicatechin had a weaker effect in increasing the GPex values at high concentrations (20 mol %), but grape seed extract showed the strongest effect. This result reveals that grape seed extract promotes a less polar or more motion-restrictive environment of the Laurdan fluorophore. In contrast, no significant changes were observed for the Laurdan GPex values at temperatures below the gel-to-liquid crystalline phase transition, that is 17 °C, when the antioxidant compounds were added to DMPC lipid dispersions (data not shown).

Steady-State Fluorescence Anisotropy. The effect of pure compounds and grape seed extract in the lipid order of the lipid bilayer was investigated by measuring the steady-state fluorescence anisotropy. Two different probes, TMA-DPH, which is localized in a superficial position of the lipid bilayer, and DPH, which is more internally localized in the membrane, were employed. Changes of the anisotropy values ($\langle r \rangle$) are indicative of variations in the lipid order or packing level of the phospholipid acyl chains. The increase of $\langle r \rangle$ value by the incorporation of some compounds to the membrane may be due to a decrease of fluorescence probes (TMA-DPH or DPH) incorporated in DMPC vesicles. Such fluorescence decrease is related to a minor rotation of the probe incorporated in DMPC vesicles produced by a decrease of the lipid fluidity. Figure 5 shows the steady-state fluorescence anisotropy for the DPH probe in DMPC membranes at the fluid state when increasing amounts of catechin, epicatechin, procyanidin B₂, or grape seed extract were included. Only grape seed extract promoted an increase of the $\langle r \rangle$ value when incorporated at high concentrations. No changes in the anisotropy values were observed when TMA-DPH was used in DMPC dispersions containing the antioxidant compounds (data not shown).

Light Scattering. The results obtained using acrylamide quenching and Laurdan fluorescence suggested that catechin monomers and procyanidin B₂ might be located close to the phospholipid/water interface or in the upper half of the phospholipid bilayer. This location would promote changes in the hydration state or packing of the phospholipid/water interface.

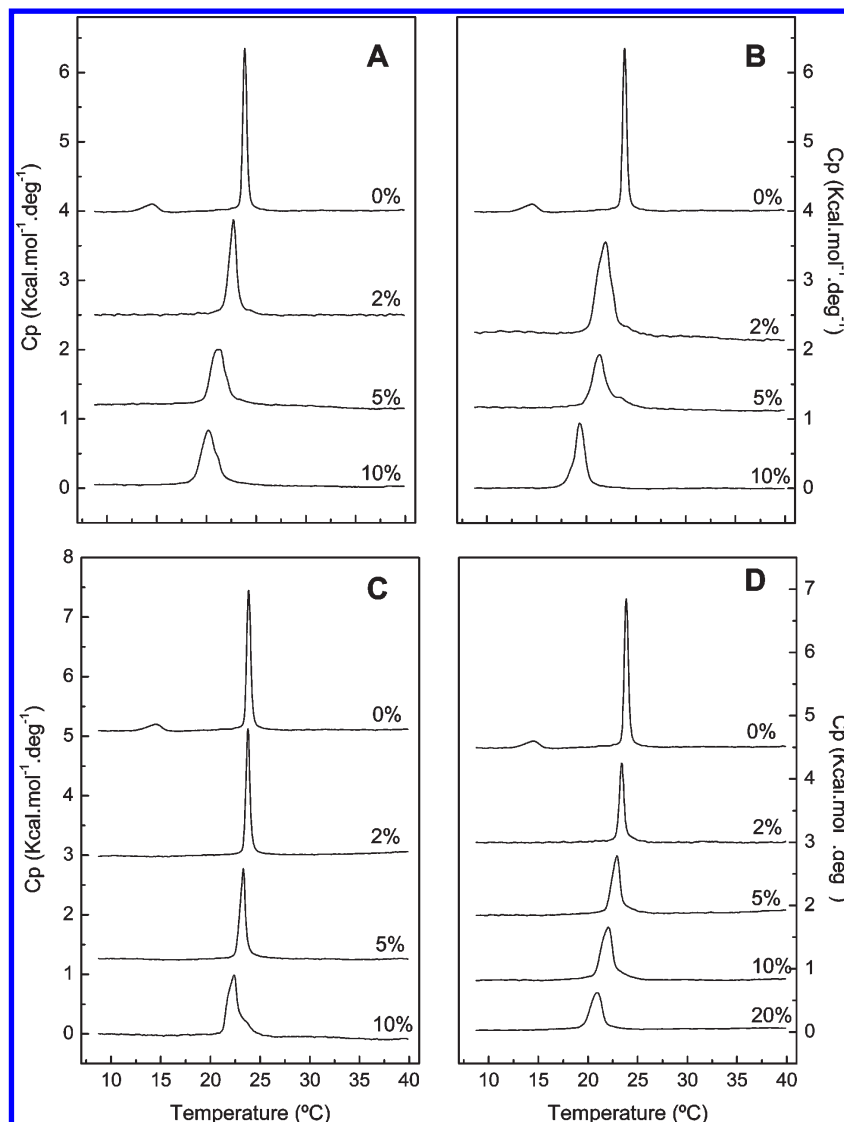


Figure 3. Differential scanning calorimetry heating-scan thermograms for mixtures of catechin-DMPC (A), epicatechin-DMPC (B), procyanidin B₂-DMPC (C), and grape seed extract-DMPC (D). Molar percentages of the compounds included in phospholipid dispersions are indicated on the curves.

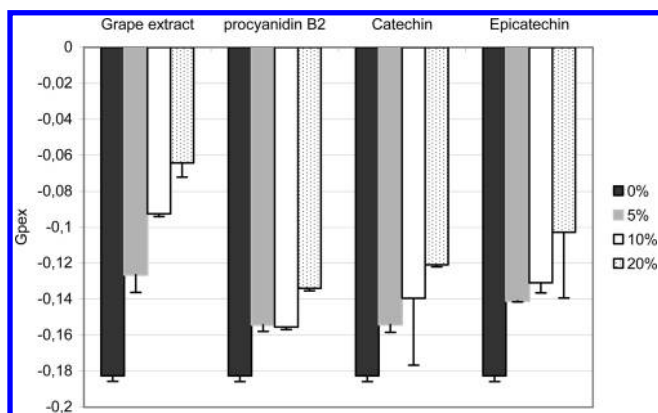


Figure 4. GPex values of Laurdan incorporated into DMPC vesicles in the liquid crystalline phase and containing increasing amounts of grape seed extract, procyanidin B₂, catechin, and epicatechin.

To test if the presence of procyanidin B₂ promoted a different packing or hydration effect on this region, solubilization experiments using a nonionic detergent such as Triton X-100 were carried out. The determination of the insolubility of lipid bilayers

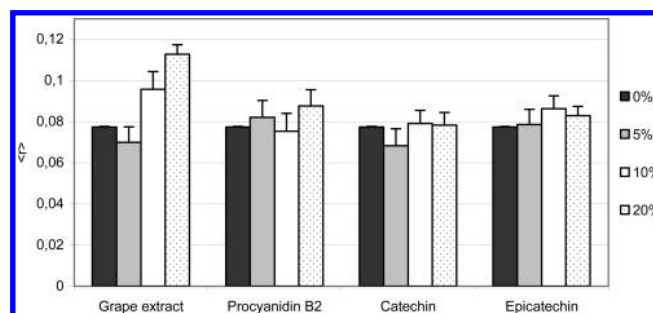


Figure 5. Steady-state fluorescence anisotropy of DPH probe incorporated in DMPC vesicles at 40 $^{\circ}\text{C}$, containing increasing amounts of grape seed extract, procyanidin B₂, catechin, and epicatechin.

in nonionic detergents like Triton X-100 is a useful method to detect the presence of tight-lipid-packing structures that avoid the solubilization of biological membranes (47). It has been previously shown that some galloylated catechins promote highly ordered structures, which protect membranes from detergent solubilization (21). Then, the capacity of the catechin monomers and procyanidin B₂ to promote resistance to solubilization was compared through the decrease of the light scattering of vesicles'

suspension containing the antioxidant compounds at 25 °C (Figure 6). The optical density of DMPC vesicles dropped rapidly meaning that the vesicles were solubilized upon the addition of Triton X-100. DMPC vesicles containing either catechin or epicatechin at 30 mol % showed similar solubilization patterns than that of DMPC vesicles. In contrast, when procyanidin B₂ was incorporated into DMPC vesicles at 30 mol %, the decay of the optical density was much slower than that one observed for the catechins-containing DMPC vesicles (Figure 6). When grape seed extract was added to DMPC multilamellar vesicles, the optical density was maintained after the TX-100 addition throughout the time of the measurement.

Comparative in Vitro Antioxidant Capacities of Catechin, Epicatechin, Procyanidin B₂, and Grape Seed Extract. Table 1 shows the results related to the ferric reducing antioxidant power measured by FRAP method, antiradical capacity through DPPH method, and metal-chelating capacity. The FRAP assay is based on the measurement of the ability of the substances to reduce Fe³⁺ to Fe²⁺. The results were expressed as micromoles Fe³⁺ per

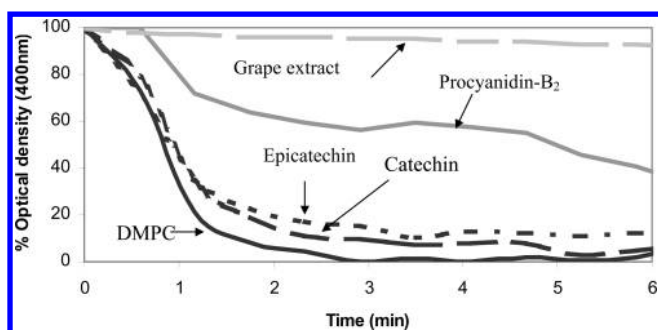


Figure 6. Triton X-100-induced solubilization of MLVs composed of pure phospholipid and mixtures of phospholipid containing 30 mol % of catechin, epicatechin, procyanidin B₂, or grape seed extract. Lipid concentration was 0.95 mM and Triton X-100 concentration was 0.25% (w/v). Curves are the average of three independent experiments.

Table 1. Values of FRAP (Micromoles of Fe³⁺ Reduced Per Micromoles of Antioxidant), Antiradical Capacity (Expressed As Micromolar Needed to Decrease by DPPH 50%), and Chelating Capacity (Calculated at 40 μM)

	reducing capacity	scavenging capacity (EC ₅₀)	chelating capacity
catechin	1.98 ± 0.08	383.5 ± 29.9	88.67 ± 2.33
epicatechin	2.39 ± 0.16	324.5 ± 27.1	84.80 ± 2.68
procyanidin B ₂	7.05 ± 0.30	148.0 ± 27.1	99.22 ± 2.52
grape seed extract	5.77 ± 0.43	153.5 ± 15.3	99.65 ± 1.91

Table 2. Values of Hydroperoxide and TBARS during Chilled Storage of Minced Fish Muscle Supplemented with Differents Antioxidants (Mean ± Standard Deviation of Experiments Performed in Triplicate)^a

day	Peroxide Values (mequiv O ₂ /kg lipid)				
	control	grape extract	procyanidin-B ₂	catechin	epicatechin
0	10.88 ± 2.23 b	4.15 ± 0.18 a	5.82 ± 4.02 ab	5.17 ± 2.48 ab	5.71 ± 1.61 a
2	88.39 ± 16.40 c	7.94 ± 1.17 a	15.28 ± 4.50 b	21.86 ± 12.18 b	12.90 ± 1.16 b
3	90.44 ± 9.60 d	4.37 ± 3.15 a	9.05 ± 1.99 a	31.28 ± 8.48 c	18.59 ± 3.16 b
5	73.99 ± 19.16 d	6.80 ± 0.59 a	19.16 ± 2.36 b	44.40 ± 7.28 c	24.66 ± 5.51 b
day	TBARS (mg MDA/kg muscle)				
	control	grape extract	procyanidin-B ₂	catechin	epicatechin
0	0.83 ± 0.24 ab	0.51 ± 0.08 a	0.55 ± 0.05 a	0.64 ± 0.01 b	0.66 ± 0.23 ab
2	7.65 ± 0.30 d	1.03 ± 0.08 a	1.58 ± 0.12 b	2.42 ± 0.33 c	2.42 ± 0.31 c
3	7.82 ± 0.24 d	1.35 ± 0.47 a	1.73 ± 0.27 a	4.01 ± 0.80 c	2.82 ± 0.54 b
5	8.01 ± 0.23 d	1.56 ± 0.56 a	2.74 ± 0.21 b	5.08 ± 0.69 c	4.22 ± 0.50 c

^a Values in each row with the same letter were not significantly different (*p* < 0.05).

micromoles of antioxidant compound. Procyanidin B₂ showed the highest power in the reduction reaction of Fe³⁺ to Fe²⁺. The order of reduction power found was procyanidin B₂ > grape seed extract > epicatechin > catechin.

The variation on the concentration of DPPH (stable free radical) was measured to estimate the concentration of antioxidant compound needed to decrease by 50% the absorbance of DPPH (EC₅₀) (Table 1). The antiradical capacity order of the antioxidant compounds according to this assay was grape seed extract > procyanidin B₂ > epicatechin > catechin.

The ferrous ions chelating capacity of the different antioxidant compounds were measured and compared to the chelating ability of ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (Table 1). The results showed that grape seed extract and procyanidin B₂ exhibited the highest chelating capacity followed by catechin and epicatechin, which showed the lowest efficiency to chelate metals.

Oxidative Stability of Fish Muscle Supplemented with Grape Seed Extract and Pure Compounds. The capacity of the catechin monomers, procyanidin B₂, and grape seed extract to inhibit lipid peroxidation in fish muscle was followed by the formation of hydroperoxides and TBARS after addition of these antioxidant agents to minced fish muscle (Table 2). When all the antioxidant agents were supplemented at 65.8 μmol/kg to chilled minced fish muscle, a significant preservation of the lipids from peroxidation was denoted. The results demonstrated the highest antioxidant efficiency of grape seed extract with no significant increment of oxidation products during the whole experiment. Fish muscle containing catechin or epicatechin showed significant differences in their antioxidant efficacy compared to the control by the fifth day, showing epicatechin higher inhibition capacity of lipid oxidation than catechin. Procyanidin B₂ shows intermediate antioxidant effectiveness compared to the monomers and the grape seed extract. Therefore, the order of the antioxidant capacity for the different antioxidant compounds was grape seed extract > procyanidin B₂ > epicatechin ~ catechin. These results were in accordance with the sensory detection of rancid off-flavors that were not detected in samples supplemented with the grape seed extract during the whole experiment.

DISCUSSION

In the present study, the antioxidant capacity of grape seed extract and its main components to inhibit oxidation in fish muscle was studied stressing their interaction and effects on phospholipid membranes. The final aim was to explain the mechanism involved in the antioxidant efficiency of these compounds in muscle foods. There is evidence to suggest that phospholipids are the primary

substrates of fish lipid oxidation (48) and the location and interaction with membranes can play a significant role in the antioxidant activity of polyphenols (21). In addition, chemical properties of antioxidants have shown a high correlation with their antioxidant efficacy found in fish muscle, in particular the reductant capacity (49).

The results obtained in this work for the *in vitro* antioxidant test do not show a clear relationship with the effectiveness found in minced fish muscle. There was a significant dependence of the *in vitro* values with the number of monomers and hydroxyl groups per molecule. According to that, FRAP measurements indicated that the amount of micromole of Fe^{3+} reduced by procyanidin B₂ or grape seed extract was higher than that corresponding to the monomers. Catechin and epicatechin showed a similar value of Fe^{3+} micromole reduced per micromole of antioxidant, but the value of epicatechin was significantly greater (Table 1). The *cis*-hydroxyl group on C-3 of the C-ring is more effective than the *trans* configuration in donating electrons making epicatechin a stronger reducing agent (50). Flavonoids with adjacent dihydroxy substituents on the B-ring have been shown to be effective in radical scavenging (51). Accordingly, the results showed lower values of EC₅₀ in the DPPH assay for procyanidin B₂ and grape seed extract compared with the monomers. This result may be related to the higher antioxidant capacity of dimeric and oligomeric B-type procyanidins toward peroxy radicals than that of catechins. Such a fact might be attributed to the presence of interflavonoid linkage, which increases the electron delocalization capacity of the phenyl radical (52). The DPPH scavenging capacity depends also on the number of *o*-hydroxyl groups per molecule.

Forming stable coordination complexes with prooxidant metals inhibits effectively the metal-catalyzed initiation of free radical oxidation and the decomposition of hydroperoxides. The results of this study show a greater capacity of procyanidin B₂ and grape seed extract to chelate Fe^{2+} . The capacity of antioxidants for chelating metals is strongly dependent on the number of *o*-hydroxylic groups (53). This could explain the higher chelating capacity of procyanidin B₂ and grape seed extract, since these compounds have a higher number of phenolic residues.

The experiment with minced mackerel muscle showed different antioxidant effectiveness depending on the antioxidant compounds employed. The grape seed extract, having a polymerization degree of 2.4 and a galloylation degree of 15%, was the most efficient followed by procyanidin B₂ and then epicatechin and catechin. Several authors have pointed out the difficulty of getting conclusions drawn from the antioxidative capacity assays. As it has been discussed above, procyanidin B₂ and grape extract showed similar chelating and scavenging antioxidant activities and they differed in the FRAP values, which was higher for procyanidin B₂. However, the grape seed extract showed significant higher activity than that of procyanidin B₂ for inhibiting oxidation in the fish minced muscle. Therefore, it seems evident that not only the chemical characteristics are important in the antioxidant mechanism. The incorporation of phenolic compounds and grape extracts into fish microsomes has been previously suggested as one decisive factor for the antioxidant efficiency of phenolics (26). Considering the significant effectiveness found for grape extracts in different muscle foods (9, 12–14), partition and interaction of their components into the oxidative sensitive sites of muscle may then play a decisive role.

The partition coefficient determined by using the intrinsic fluorescence of catechins and procyanidin B₂ showed that procyanidin B₂ showed stronger affinity for DMPC membranes than catechin monomers. The polymeric character of procyanidin B₂ compared with catechin and epicatechin could explain its higher

partition coefficient compared to the monomers through hydrogen-bond formation with some groups of the lipid/water interface. Some authors have demonstrated that catechins with a higher number of hydroxyl groups are able to form a higher number of H-bonds between the compound and the bilayer surface (25). These results were compatible with those values obtained with octanol/water partition or RP-HPLC (22, 54).

The results derived from the experiments of membrane localization using spin probes showed a superficial localization of catechin and epicatechin and a more internal situation of procyanidin B₂ probably placed near to the phospholipid/water interface. The superficial localization of catechin and epicatechin has been also reported (21, 54). Quenching experiments using acrylamide confirmed that procyanidin B₂ was less accessible to the quencher in the presence of phospholipid membranes.

DSC experiments showed that the addition of the different compounds studied did not produce drastic changes in the gel-to-liquid crystalline phase transition of DMPC. Nonetheless, the pretransition was abolished at low concentrations of the compounds and the main phase transition was broadened when higher concentrations were utilized. This effect would indicate that the monomeric catechins and procyanidin B₂ would somehow weaken the hydrophobic interactions between phospholipid acyl chains on DMPC and decrease the cooperativity of the transition phase process. A similar arrangement has been postulated for several phenolic compounds such as triclosan (55) and the diterpenoids totarol (56) and abietic acid (57).

The spectroscopic properties of the Laurdan probe were used to examine the polarity and dynamics of the lipid–water interface in model membranes containing catechin monomers or procyanidin B₂. GPex values of Laurdan enhanced as the amount of the compounds was increased in fluid DMPC vesicles. Grape seed extract promoted the strongest increase in the GPex values. An increase in the GPex value can be interpreted as a decrease in water-free movement or hydration at the phospholipid interface of the bilayer due to dipolar relaxation processes of the water molecules surrounding Laurdan chromophore, which indicates less accessibility of water-soluble substances to the surface of the membrane (58, 59). A similar effect has been observed in phospholipid bilayers containing cholesterol (46) or rosemary diterpenes (60). Then, we postulate that some components present in grape seed extract would promote a dehydration effect in the phospholipid water interface. A decrease of the water molecules movement due to a packing effect at the polar head groups should be discarded, since no effect was observed in the behavior of the TMA-DPH anisotropy probe, as observed for bilayers containing neoglycolipids (61).

The steady-state fluorescence anisotropy experiments only showed a decrease of the membrane fluidity when grape seed extract was included in DMPC vesicles containing the DPH probe, indicating that some components of grape seed extract are situated in an internal zone of the lipid bilayer. Others authors (21) have reported that galloylated catechins induced a decrease of membrane fluidity. Therefore, the presence of galloyl groups in the grape seed extract might be the reason of the membrane-rigidifying effects observed at the core of the bilayer.

The results of Triton X-100 solubilization experiments showed less accessibility of the nonionic detergent into the phospholipid bilayer for grape seed extract and procyanidin B₂. Hence, the presence of tight-lipid-packing structures in the surface of the phospholipid bilayer for procyanidin B₂ and grape seed extract could be suggested. However, since a decrease of the fluidity in the superficial zone of phospholipid bilayer was not observed by the studies performed with the TMA-DPH probe, the reason of the decrease of membrane solubility in the presence of Triton may

be associated with significant bonds between the phospholipid head groups and procyanidin B₂ or other major compounds of grape seed extract. Verstraeten et al. (62) have reported that dimers of catechins produced a more efficient protection of bilayer from Triton X-100 than monomers, indicating that water-soluble substances are less accessible to the hydrophobic region of membrane. The formation of H-bonds between flavonoids and the polar headgroup of lipids at the water–lipid interface of membranes has been suggested for explaining this finding (60). Sirk et al. (25) also observed a greater number of H-bonds between some compounds having higher number of hydroxyl groups and the phospholipid bilayer.

Considering the above exposed, it seems evident that there is a correlation among the effectiveness of the antioxidant compounds in fish muscle and the partition and location of these compounds in membranes, their effects on phospholipid order, and interaction with the membrane surface. Therefore, the results obtained through this work stress that the physical interactions of the antioxidants with the oxidative sensitive sites of the muscle food might play also a decisive role on the kinetics of lipid oxidation.

In conclusion, the antioxidant efficacy observed for procyanidin B₂, grape seed extract, and monomeric catechins for inhibiting lipid oxidation of fish muscle can be assigned to the following reasons:

- (I) The less hydration of the lipid/water interface observed by the increase of GPex values. This could reduce the contact of prooxidants compounds as Fe²⁺ or hemoglobin and the penetration of free radicals into the phospholipid membrane. The formation of highly ordered structures probably decreases the accessibility of free radicals into hydrocarbon chain of PUFAs that can initiate or propagate the lipid oxidation.
- (II) The localization of procyanidin B₂ and grape seed extract compounds into lipid bilayers, probably by H-bond interaction with polar head groups, could inhibit free radical propagation through the formation of rigid structures. This localization of the compound close to the active points of oxidation would help to inhibit lipid oxidation more efficiently considering their chemical antioxidant properties.
- (III) The greater capacity of the grape seed extract and procyanidin B₂ for chelating metals, donating electrons, and scavenging free radicals contribute to explain the higher antioxidant capacity found in fish muscle against catechin and epicatechin.

LITERATURE CITED

- (1) Ackman, R. G. *Marine biogenic lipids, fats and oils*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1989; Vol. II.
- (2) Lee, K. W.; Lip, G. Y. H. The role of omega-3 fatty acids in the secondary prevention of cardiovascular disease. *QJM* **2003**, *96* (7), 465–480.
- (3) Kanner, J. Oxidative processes in meat and meat products quality implications. *Meat Science* **1994**, *36*, 169–189.
- (4) Richards, M. P.; Kelleher, S. D.; Hultin, H. O. Effect of washing with or without antioxidants on quality retention of mackerel fillets during refrigerated and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4363–4371.
- (5) Vermeiren, L.; Devlieghere, F.; van Beest, M.; de Kruijff, N.; Debevere, J. Developments in the active packaging of foods. *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, *10* (3), 77–86.
- (6) Sivertsvik, M.; Jeksrud, W. K.; Rosnes, J. T. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products ; significance of microbial growth, activities and safety. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2002**, *37* (2), 107–127.
- (7) Losada, V.; Barros, J.; Aubourg, S. Rancidity development in frozen fish: influence of slurry ice as preliminary chilling treatment. *LWT* **2006**, *40*, 991.
- (8) Let, M. B.; Jacobsen, C.; Pham, K. A.; Meyer, A. S. Protection against Oxidation of Fish-Oil-Enriched Milk Emulsions through Addition of Rapeseed Oil or Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (13), 5429–5437.
- (9) Pazos, M.; Gallardo, J. M.; Torres, J. L.; Medina, I. Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chem.* **2005**, *92*, 547–557.
- (10) Pazos, M.; González, M. J.; Gallardo, J. M.; Torres, J. L.; Medina, I. Preservation of the endogenous antioxidant system of fish muscle by grape polyphenols during frozen storage. *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, *220*, 514–519.
- (11) Yilmaz, Y.; Toledo, R. T. Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 422–433.
- (12) Bañón, S.; Diaz, P.; Rodríguez, M.; Garrido, M. D.; Price, A. Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. *Meat Science* **2007**, *77* (4), 626–633.
- (13) Lau, D. W.; King, A. J. Pre- and Post-Mortem Use of Grape Seed Extract in Dark Poultry Meat To Inhibit Development of Thio-barbituric Acid Reactive Substances. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (6), 1602–1607.
- (14) Carpenter, R.; O'Grady, M. N.; O'Callaghan, Y. C.; O'Brien, N. M.; Kerry, J. P. Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork. *Meat Science* **2007**, *76* (4), 604–610.
- (15) Brannan, R. G., Effect of grape seed extract on physicochemical properties of ground, salted, chicken thigh meat during refrigerated storage at different relative humidity levels. *J. Food Sci.* **2008**, *73*, (1).
- (16) Alamed, J.; Chaayasit, W.; McClements, D. J.; Decker, E. A. Relationships between Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity in Foods. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (7), 2969–2976.
- (17) Raghavan, S.; Hultin, H. O. Distribution of Exogenous α -Tocopherol between the Membrane Lipids and Triacylglycerols of a Cod Muscle Triacylglycerol Model System. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (20), 6294–6299.
- (18) Richards, M. P.; Hultin, H. O. Rancidity development in a fish model system as affected by phospholipids. *J. Food Lipids* **2001**, *8*, 215–230.
- (19) Igene, J. O.; Pearson, A. M.; Dugan, A. M.; Price, J. F. Role of triglycerides and phospholipids on development of rancidity in model meat systems during frozen storage. *Food Chem.* **1980**, *5*, 263–276.
- (20) Gandemer, G. Lipids and meat quality: lipolysis, oxidation, Maillard reaction and flavour. *Sci. Aliments* **1999**, *19*, 439–458.
- (21) Caturla, N.; Vera-Samper, E.; Villalain, J.; Mateo, C. R.; Micol, V. The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Biol. Med.* **2003**, *34* (6), 648–662.
- (22) Hashimoto, T.; Kumazawa, S.; Nanjo, F.; Hara, Y.; Nakayama, T. Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated with liposome systems. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63* (12), 2252–2255.
- (23) Tsuchiya, H. Effects of green tea catechins on membrane fluidity. *Pharmacology* **1999**, *59* (1), 34–44.
- (24) Gutiérrez, M. E.; García, A. F.; Africa de Madariaga, M.; Sagrista, M. L.; Casadó, F. J.; Mora, M. Interaction of tocopherols and phenolic compounds with membrane lipid components: Evaluation of their antioxidant activity in a liposomal model system. *Life Sci.* **2003**, *72* (21), 2337–2360.
- (25) Sirk, T. W.; Brown, E. F.; Friedman, M.; Sum, A. K. Molecular Binding of Catechins to Biomembranes: Relationship to Biological Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (15), 6720–6728.
- (26) Pazos, M.; Lois, S.; Torres, J. L.; Medina, I. Inhibition of hemoglobin- and iron-promoted oxidation in fish microsomes by natural phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (12), 4417–4423.
- (27) Torres, J. L.; Varela, B.; García, M. T.; Carilla, J.; Matito, C.; Centelles, J. J.; Cascante, C.; Sort, X.; Bobet, R. Valorization of

- grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7548–7555.
- (28) Torres, J. L.; Lozano, C. Chromatographic characterization of proanthocyanidins after thiolysis with cysteamine. *Chromatographia* **2001**, *54* (7–8), 523–526.
 - (29) Mayer, L. D.; Hope, M. J.; Cullis, P. R. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1986**, *858* (1), 161–168.
 - (30) Battcher, C. J. F.; Van gent, C. M.; Pries, C. A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. *Anal. Chim. Acta* **1961**, *24* (C), 203–204.
 - (31) Santos, N. C.; Prieto, M.; MA., C. Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *10* (1612(2)), 123–35.
 - (32) Eftink, M. Fluorescence methods for studying equilibrium macro-molecule-ligand interactions. *Methods Enzymol.* **1997**, *278*, 221–57.
 - (33) Wardlaw, J. R.; Sawyer, W. H.; Ghiggino, K. P. Vertical fluctuations of phospholipid acyl chains in bilayers. *FEBS Lett.* **1987**, *223* (1), 20–24.
 - (34) Böttcher, C. J. F.; Van gent, C. M.; Pries, C. A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. *Anal. Chim. Acta* **1961**, *24* (C), 203–204.
 - (35) Parasassi, T.; De Stasio, G.; Ravagnan, G.; Rusch, R. M.; Gratton, E. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* **1991**, *60* (1), 179–89.
 - (36) Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76.
 - (37) Kolayli, S.; Ocak, M.; Kucuk, M.; Abbasoglu, R. Does caffeine bind to metal ions? *Food Chem.* **2004**, *84*, 383–388.
 - (38) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT—Food Sci. Technol.* **1995**, *28* (1), 25–30.
 - (39) von Gadow, A.; Joubert, E.; Hansmann, C. F. Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45* (3), 632–638.
 - (40) Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917.
 - (41) Herbes, S. E.; Allen, C. P. Lipid quantification of freshwater invertebrates: method modification for microquantitation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1983**, *40* (8), 1315–1317.
 - (42) Chapman, R. A.; Mackay, K. The estimation of peroxides in fats and oils by ferric thiocyanate method. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1949**, *26*, 360–363.
 - (43) Vyncke, W. Direct Determination of the Thiobarbituric Acid Value in Trichloroacetic Acid Extracts of Fish as a Measure of Oxidative Rancidity. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **1970**, *72* (12), 1084–1087.
 - (44) Sokal, R. R.; Rohlf, F. J. *Biometry: the principals and practice of statistics in biological Research*, Third Edition. W.H. Freeman and Company: San Francisco, CA, 1994.
 - (45) Parasassi, T.; Krasnowska, E. K.; Bagatolli, L.; Gratton, E. Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes. *J. Fluoresc.* **1998**, *8* (4), 365–373.
 - (46) Parasassi, T.; Di Stefano, M.; Loiero, M.; Ravagnan, G.; Gratton, E. Cholesterol modifies water concentration and dynamics in phospholipid bilayers: A fluorescence study using Laurdan probe. *Biophys. J.* **1994**, *66* (3), 763–768.
 - (47) London, E.; Brown, D. A. Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2000**, *1508* (1–2), 182–195.
 - (48) Wilson, B. R.; Pearson, A. M.; Shorland, F. B. Effect of total lipids and phospholipids on warmed-over flavor in red and white muscle from several species as measured by thiobarbituric acid analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *24* (1), 7–11.
 - (49) Medina, I.; Gallardo, J. M.; Gonzalez, M. J.; Lois, S.; Hedges, N. Effect of molecular structure of phenolic families as hydroxycinnamic acids and catechins on their antioxidant effectiveness in minced fish muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (10), 3889–3895.
 - (50) Tsao, R.; Yang, R.; Xie, S.; Sockovie, E.; Khanizadeh, S. Which Polyphenolic Compounds Contribute to the Total Antioxidant Activities of Apple? *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (12), 4989–4995.
 - (51) Zheng, W.; Wang, S. Y. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *51* (2), 502–509.
 - (52) Ursini, F.; Rapuzzi, I.; Toniolo, R.; Tubaro, F.; Bontempelli, G.; Lester, P. Characterization of antioxidant effect of procyanidins. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: New York, 2001; Vol. 335, pp 338–350.
 - (53) Frankel, E. N. *Lipid Oxidation*; The Oily Press: Dundee, Scotland, 1998.
 - (54) Kajiya, K.; Kumazawa, S.; Nakayama, T. Steric Effects on Interaction of Tea Catechins with Lipid Bilayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65* (12), 2638–2643.
 - (55) Villalain, J.; Mateo, C. R.; Aranda, F. J.; Shapiro, S.; Micol, V. Membranotropic Effects of the Antibacterial Agent Triclosan. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *390* (1), 128–136.
 - (56) Micol, V.; Mateo, C. R.; Shapiro, S.; Aranda, F. J.; Villalain, J. Effects of (+)-tatarol, a diterpenoid antibacterial agent, on phospholipid model membranes. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2001**, *1511* (2), 281–290.
 - (57) Aranda, F. J.; Villalain, J. The interaction of abietic acid with phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1997**, *1327* (2), 171–180.
 - (58) Parasassi, T.; Giusti, A. M.; Gratton, E.; Monaco, E.; Raimondi, M.; Ravagnan, G.; Saporita, O. Evidence for an increase in water concentration in bilayers after oxidative damage of phospholipids induced by ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **1994**, *65* (3), 329–334.
 - (59) Parasassi, T.; De Stasio, G.; Ravagnan, G.; Rusch, R. M.; Gratton, E. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* **1991**, *60* (1), 179–189.
 - (60) Pérez-Fons, L.; Garzón, M. T.; Micol, V. Relationship between the Antioxidant Capacity and Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Polyphenols on Membrane Phospholipid Order. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *58* (1), 161–171.
 - (61) del Carmen Luzardo, M.; Bernik, D. L.; Pazos, I. F.; Figueroa, S.; Lanio, M. E.; Vérez, V.; Disalvo, E. A. Phase and Surface Properties of Lipid Bilayers Containing Neoglycolipids. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *363* (1), 81–90.
 - (62) Verstraeten, S. V.; Keen, C. L.; Schmitz, H. H.; Fraga, C. G.; Oteiza, P. I. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radical Biol. Med.* **2003**, *34* (1), 84–92.

Received for review January 26, 2010. Revised manuscript received June 16, 2010. Accepted June 21, 2010. This investigation has been supported by the Spanish Ministry of Science (Grants AGL2006-12210-C03-01 and AGL2007-60778). The Spanish Ministry of Science is gratefully acknowledged by doctoral fellowship to R.M and L.F.

CAPÍTULO 3

INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN INICIAL EN EL DESARROLLO DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN MÚSCULO PICADO DE CABALLA

3. INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN INICIAL EN EL DESARROLLO DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN MÚSCULO PICADO DE CABALLA.

3.1 Introducción

La estabilidad de los productos pesqueros y derivados de la pesca está drásticamente disminuida por su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), que son muy susceptibles a desarrollar degradación oxidativa. La aparición de aromas asociados a la rancidez, principalmente durante su almacenamiento congelado, es uno de los mayores problemas que lleva asociado la comercialización y venta de especies de pescado grasas y semigrasas (218).

La oxidación lipídica es un proceso ampliamente influenciado tanto por factores externos como internos al pescado o productos derivados de la pesca. La cantidad y el tipo de sustrato, junto con la presencia de antioxidantes y prooxidantes endógenos son factores decisivos a la hora de determinar la susceptibilidad de un pescado o producto derivado de la pesca a desarrollar la oxidación lipídica. La elevada susceptibilidad de las especies grasas de pescado ha sido habitualmente asociada con la alta cantidad de PUFAs (219). El contenido total en PUFAs, junto con la presencia de hierro de bajo peso molecular y hemoproteínas han sido sugeridos como los compuestos clave en la evolución de la oxidación lipídica en cerdo, ternera y pollo (220). El balance entre el contenido total de antioxidantes y la capacidad prooxidante parece ser determinante en el inicio de la oxidación lipídica (221). El sistema antioxidante endógeno es otro factor que juega un papel decisivo en el inicio de la oxidación lipídica (40). La pérdida de tocoferol endógeno determina el inicio de la oxidación (222), si bien la pérdida de otros antioxidantes endógenos se ha asociado a la regeneración del tocoferol (223) y por tanto, a una cierta estabilización del equilibrio oxidativo. Sin embargo, todavía no se conoce el efecto global de cada parámetro composicional en el mantenimiento de este balance redox, y por consiguiente, en la evolución de la oxidación lipídica en el pescado y productos derivados de la pesca. El conocimiento de estos efectos es fundamental para poder desarrollar herramientas que permitan predecir la vida útil del pescado o producto derivado de la pesca.

El objetivo de esta parte de la tesis consistió en determinar la contribución de la composición inicial en el desarrollo de la oxidación lipídica, con la finalidad de evaluar la contribución de cada parámetro. Para alcanzar dicho propósito, el contenido inicial de los componentes mayoritarios (agua, lípidos totales, proteínas y PUFAs) y minoritarios

(ácido ascórbico, tocoferol, hemoglobina, hierro total, hierro de bajo peso molecular, cobre y zinc), así como la evolución de la oxidación lipídica de diferentes sistemas de músculo picado de caballa (*Scomber scombrus*) y la relación entre ambos fue estudiada a través de varias herramientas estadísticas.

3.2 PUBLICACIÓN

Role of Raw Composition of Pelagic fish Muscle on the
Development of Lipid Oxidation and Rancidity during Storage.

Rodrigo Maestre, Manuel Pazos, and Isabel Medina

J. Agric. Food Chem. 2011, 59, 6284–6291

Role of the Raw Composition of Pelagic Fish Muscle on the Development of Lipid Oxidation and Rancidity during Storage

Rodrigo Maestre,* Manuel Pazos, and Isabel Medina

Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Eduardo Cabello 6, E-36208 Vigo, Spain

ABSTRACT: The muscle composition of a pelagic fish species, Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*), has been studied to determine the relationship with its susceptibility to develop lipid oxidation during chilled storage. For such an aim, the initial concentrations of the major components (water, total lipids, protein, and PUFAs) and minor pro-oxidant and antioxidant components (ascorbic acid, α -tocopherol, hemoglobin, total iron, LMW-iron, copper, and zinc) of different batches of mackerel were characterized. For the study, several batches of mackerel were caught during the spring and summer periods. The different batches were subjected to chilled storage, and the onset of lipid oxidation was statistically related with the initial muscle composition. Results showed significant compositional differences among the mackerel lots, especially for the muscle lipid content (2.83–9.50%). In a first step, a Pearson correlation test was used to check the influence of each component on the progress of lipid oxidation. Results showed a significant relationship between shelf life and water and total lipid contents. Multiple regression was performed to reveal the contribution of each component to the susceptibility to lipid oxidation. The model obtained combines the content of PUFAs, total iron, hemoglobin, and ascorbic acid. An accurate prediction of shelf life in terms of rancidity was achieved by the model created ($R^2 = 0.9975$). These results establish that the levels of endogenous pro-oxidants and antioxidants present in fish muscle together with the polyunsaturated lipids are relevant factors affecting the shelf life of mackerel muscle.

KEYWORDS: lipid oxidation, mackerel, Pearson correlation, multiple regressions, shelf life

INTRODUCTION

Pelagic fish is extremely rich in essential ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as eicosapentaenoic acid (20:5 ω -3) and docosahexanoic acid (22:6 ω -3). Such fatty acids have shown potential benefits for human health.^{1,2} However, the oxidative degradation of unsaturated fatty acids is the major cause of quality deterioration in pelagic fish species, leading to the development of rancid off-odors and a reduction of the nutritional value.

Lipid oxidation in fish muscle based foods is influenced by external factors such as storage temperature, time, precooking, processing, or packaging.^{3,4} Internal factors related to the composition of muscle also play a key role in the oxidative reaction. According to the radical nature of the reaction, lipid oxidation is sensitive to substances able to catalyze or inhibit the formation of free radicals. In pork, beef, and chicken, the total content of PUFAs together with the presence of pro-oxidant heme proteins and free ionic iron has been suggested to play an important role in lipid oxidation.⁵ The different sources of iron and their concentrations have also demonstrated a relative impact on meat lipid oxidation.⁶ In these studies the balance between the total antioxidant/pro-oxidant capacities of meat seemed to be significant for determining the onset of lipid oxidation. Food processing also affects largely the state of intrinsic components. Meat thermal treatments are described to disrupt membranes, release iron, and accelerate the diffusion of reactants, leading to the propagation of oxidation.⁷

Studies performed on the oxidation of fish muscle based foods reveal a more complex situation, mainly attributed to a higher proportion and variety of PUFAs⁸ and a major pro-oxidant activity of fish hemoglobins.⁷ Additionally, pelagic fish species are characterized by huge variations in compositional parameters

depending on season and food availability.^{9–11} Such variability affects the content of fat and the levels of antioxidants and pro-oxidants. Various attempts using model systems have been made to investigate the role of lipids and promoters of oxidation on the development of lipid oxidation. The elevated susceptibility of fatty fish species to undergo lipid oxidation is often attributed to their intrinsic amount of PUFAs.¹² However, Undeland et al.¹³ reported that the incorporation of 15% fish triacylglycerols to washed cod mince did not accelerate the formation of rancid off-odors. In different washed fish mince model systems, the total content of lipids showed a lower contribution than Hb to the development of oxidation.¹⁴ Phospholipids have been denoted the primary substrate for fish lipid oxidation due to their high proportion of PUFAs.¹⁵ Consequently, there is not a clear conclusion about the real influence of fat content on fish oxidation, and which are the decisive components that govern lipid oxidation in fish. Redox active metals such as iron and copper have been also described to enhance lipid oxidation in fish muscle due to their capacity to generate free radicals via Fenton-type reaction or hydroperoxides decomposition.¹⁶

The endogenous antioxidant system of fish that includes lipophilic and hydrophilic compounds has been also shown to influence the onset of fish lipid oxidation.¹⁴ The loss of endogenous α -tocopherol seems to mark the onset of the propagation phase of lipid oxidation.¹⁷ Other endogenous antioxidants such as ascorbic acid, which is lost in the early post-mortem stages, are important for maintaining of α -tocopherol in its original reduced

Received: February 18, 2011

Revised: May 2, 2011

Accepted: May 2, 2011

Published: May 02, 2011

state.¹⁸ The depletion order for endogenous antioxidants agrees with their “pecking order”, which predicts a faster consumption of ascorbic acid than of α -tocopherol on the basis of the one electron reduction potential.¹⁹ This must be considered in studies aimed to determine the oxidative susceptibility of fish muscle. Accordingly, the relationship between endogenous antioxidants and pro-oxidants of fish muscle is important to maintain the redox balance and must be considered in studies aimed to prevent lipid oxidation.^{17,20}

This work aimed to evaluate the contribution of the initial composition of fish muscle on the development of lipid oxidation occurring during post-mortem storage. The experiments were performed directly in fish muscle because it provides more realistic information than model systems as all components are collectively studied at their original concentrations. Compositional variations of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) caught at different seasonal periods were investigated and, then, related to their oxidative susceptibility during chilled storage. The influence of either major components (water, lipids, PUFAs, and protein) or minor components (ascorbic acid, α -tocopherol, hemoglobin, total iron, nonheme iron, copper, and zinc) on the progress of lipid oxidation was first investigated by lineal univariate regressions. The effect of raw composition on lipid oxidation was then evaluated by multiple regressions to gain knowledge of the relationship between several compositional variables and the shelf life of pelagic fish muscle in terms of oxidation.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Metaphosphoric acid, ascorbic acid (AA), dehydroascorbic acid (DHAA), iodine, 4,5-dimethyl-*o*-phenylenediamine (DMPD), bovine hemoglobin (Hb), sodium heparin, sodium chloride, tris-[hydroxymethyl]aminoethane (Tris), sodium dithionite, dibasic sodium phosphate, monobasic sodium phosphate potassium chloride, sodium dodecyl sulfate (SDS), DL-*all-rac*- α -tocopherol, ferrous chloride ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), ferric chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), and streptomycin sulfate were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Standards of methyl fatty acids were also obtained from Sigma-Aldrich. Potassium iodide was obtained from Fluka (New-Ulm, Switzerland) and sodium thiosulfate from BDH (Poole, U.K.). Isobutanol was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals and solvents used were of either analytical or HPLC grade. Water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Billerica, MA). Carbon monoxide (99.97% purity) was provided by Air Liquide (Porriño, Spain).

Fish Supply. Seven different batches of fresh Atlantic mackerel (*S. scombrus*) were supplied by Vigo local markets during March 2009–July 2010. Each batch contained 8–10 kg of fish (20–30 individuals). Mackerel presented an extra quality of freshness according to EU regulations.²¹

Chilled Minced Mackerel. After arrival at the laboratory, each batch of fish was deboned and eviscerated, and the white muscle without skin was separated. The white muscle was chopped with a grinder machine, hole of 5 mm, to obtain homogeneous minced fish muscle. Streptomycin sulfate (200 ppm) was added to inhibit microbial growth during chilled storage. For each batch, initial compositional data were directly obtained in triplicate from the fresh minced muscle. For the lipid oxidation experiments, minced fish muscle was aliquotted in portions of 10 g and stored in 50 mL Erlenmeyer flasks at 4 °C. In each sampling time, lipid hydroperoxides and sensorial analysis were performed in triplicate.

Water Determination. The water content was determined according to the AOAC official method.²²

Protein Determination. The AOAC Kjeldahl procedure was employed to estimate the protein content.²³

Lipid Extraction. Lipids were extracted from fish muscle according to the method of Bligh and Dyer²⁴ and quantified gravimetrically.²⁵

Fatty Acid Analysis. Fatty acids were methylated according to the method of Lepage and Roy,²⁶ and fatty acid 19:0 was added as an internal standard. The fatty acid methyl esters (FAME) were analyzed using a capillary gas chromatograph equipped with an autoinjector coupled to a flame ionization detector (Perkin-Elmer, Waltham, MA). The oven temperature started at 140 °C and reached 205 °C at an increment of 1 °C/min. The carrier gas was nitrogen, and splitless injection (1 μL) was done at 275 °C. The detector temperature was 260 °C. Fatty acids were identified by comparison of retention times with a mixture of standards. Results are expressed both as milligrams per kilogram of sample and as a percentage of the total fatty acids.

Determination of α -Tocopherol Concentration. α -Tocopherol (α -TOH) was extracted from fish muscle by adaptation of the procedure of Burton et al.²⁷ as described by Pazos et al.²⁸ The analysis of α -TOH was performed by HPLC according to the method of Cabrini et al.;²⁹ the chromatograph was coupled to a fluorescence detector (Exc 292/Em 328). α -TOH levels were expressed in milligrams per kilogram of muscle.

Determination of Ascorbate Concentration. Ascorbate (AsCH^-) was acidically extracted from the minced fish muscle, oxidized, derivatized with DMPD, and analyzed by HPLC coupled to a fluorescence detector according to the method of Iglesias et al.³⁰

Extraction and Quantification of Heme Proteins. Heme proteins were extracted from mackerel muscle according to the method of Larsson et al.³¹ Briefly, samples were homogenized in a 50 mM Tris buffer (pH 8.0) containing 80 mM KCl and 1 mM EDTA. The homogenate was centrifuged at 37000g for 40 min at 4 °C, and the supernatant was filtered through a filter paper. Quantification of heme protein was done in duplicate on each sample extract according to the method by Brown³² as modified by Richards and Hultin.³³ Bovine Hb was used to prepare the standard curve, and the results were expressed as micromoles of Hb per kilogram of sample (w/w).

Content of Total Iron, Copper, and Zinc. The total levels of the redox-active transition metals iron, copper, and zinc were determined as described by AOAC official method.³⁴ Briefly, samples were digested in nitric acid and hydrogen peroxide in a microwave oven and analyzed by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES). The emission lines employed for iron, copper, and zinc were 238.204, 324.752, and 206.200 nm, respectively. The nonheme iron or low molecular weight iron (Fe-LMW) was determined as the difference between total iron and heme iron.

Sensory Analysis. Sensory detection of rancid odors was evaluated by an expert panel formed by four trained specialists in descriptive analysis of fishy off-odors. The determination was made in a room designed for such a purpose after the samples had been held during 10 min at room temperature. Approximately 10 g was placed in separate sterile polystyrene Petri dishes and put on a tray of ice. Panelists concentrated on detecting rancidity/painty odors using a structured scale, from 8 (absolutely fresh) to 1 (putrid).³⁵

Peroxide Value. The formation of the primary lipid oxidation products, lipid peroxides, in chilled fish muscle was determined at the different sampling times by using the ferric thiocyanate method³⁶ and expressed as milliequivalents of oxygen per kilogram of muscle.

Shelf Life. A refusal value of hydroperoxides, corresponding to 0.70 mequiv oxygen/kg muscle, was fixed by the expert panel according to the appearance of the incipient rancid off-odors in mackerel muscle. This shelf life shows the useful commercial period of the fish minced before it provokes refusal for the customer due to rancidity. It was graphically calculated for each experiment (Figure 1).

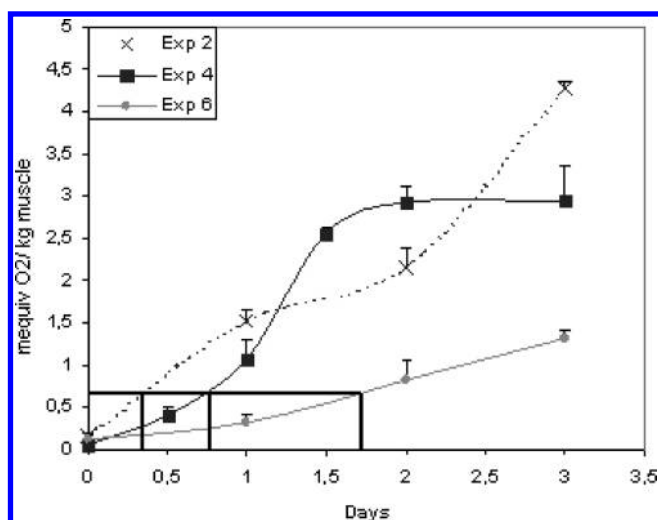


Figure 1. Kinetics of the formation of lipid peroxides during chilled storage for oxidation experiments 2, 4, and 6, and calculation of the shelf life referred to the formation of rancid odors. Mackerel muscle of experiments 2, 4, and 6 contained, respectively, fat levels of 78.2, 45.2, and 28.7 g fat/kg muscle.

Statistical Analysis. All analyses were performed in triplicate, and data are reported as the mean \pm standard deviation. Simple correlations among the compositional parameters and the lipid oxidation vulnerability were evaluated by Pearson coefficients. Multiple regressions were established by using the forward stepwise addition technique in which variables are sequentially added to an “empty” model.³⁷ Statistical analyses were performed with the software Statistica 6.0. (StatSoft Inc., Tulsa, OK).

RESULTS AND DISCUSSION

Initial Compositional Data. Table 1 shows the average levels of both major components (proteins, total lipids, water, and PUFAs) and minor components (ascorbic acid, α -tocopherol, hemoglobin, total iron, LMW-iron, copper, and zinc) corresponding to the mackerel batches caught during spring and summer and potentially involved in the progress of lipid oxidation. In addition, Pearson correlations are shown to illustrate the relationship between these factors (Table 2).

The contents of minor and major components of the different batches of mackerel exhibited wide variability. The percentage of water and total lipids in white muscle displayed high variations from 69.1 to 77.00% and from 28.3 to 95.0 mg/g, respectively (Table 1). However, the total protein content showed a lower variability, with values ranging between 18.5 and 20.8%. A significant inverse correlation was found between the water and fat contents ($p < 0.05$), consistent with the lowest water content found for the fattiest muscle (Table 2). The differences in fat content are probably a result of the energy requirements of migrations that commonly precede or accompany sexual maturation and spawning of mackerel.³⁸ Therefore, the extensive lipid variation is principally attributable to changes in the triglyceride content because the phospholipid fraction remains moderately constant.³⁹

Analysis of the fatty acid profile detected significant differences among the lots of mackerel (Table 3). The results showed a high percentage of the monounsaturated fatty acids 22:1 ω -11 and 20:1 ω -9 in batches 1 and 4. These batches correspond to the first units of mackerel captured in 2009 and 2010. This indicates that

Table 1. Initial Compositional Data of the Mackerel Mince Used in Each Experiment and Time for Detection of Incipient Rancid Odors^a

batch	water (%)	protein (%)	lipid content (g/kg muscle)	ascorbic acid (mg/kg muscle)	TOH (mg/kg muscle)	Hb (μ mol/kg muscle)	total Fe (mg/kg muscle)	Fe-LMW (mg/kg muscle)	Cu (mg/kg muscle)	Zn (mg/kg muscle)	PUFA (g/kg muscle)	shelf life (days)
1	76.9 \pm 0.1	18.79 \pm 0.30	28.3 \pm 0.31	5.28 \pm 0.67	4.5 \pm 0.19	9.5 \pm 0.27	2.41 \pm 0.27	0.282	0.478 \pm 0.011	3.02 \pm 0.04	16.32 \pm 0.40	2.11
2	71.02 \pm 0.62	20.23 \pm 0.47	78.2 \pm 0.65	7.78 \pm 0.45	5.64 \pm 0.41	9.22 \pm 0.31	2.63 \pm 0.11	0.565	0.413 \pm 0.008	3.19 \pm 0.05	30.47 \pm 0.24	0.35
3	73.8 \pm 0.5	20.8 \pm 0.7	51.1 \pm 4.23	10.59 \pm 0.85	6.05 \pm 0.63	8.5 \pm 0.40	2.42 \pm 0.12	0.370	0.422 \pm 0.007	3.36 \pm 0.04	19.04 \pm 0.8	1.697
4	74.4 \pm 0.19	19.9 \pm 0.56	45.2 \pm 4.5	2.89 \pm 0.11	0.93 \pm 0.03	10.89 \pm 1.00	4.44 \pm 0.34	2.000	0.290 \pm 0.02	3.28 \pm 0.06	9.11 \pm 1.68	0.76
5	71.6 \pm 0.37	18.5 \pm 0.16	75.4 \pm 6.33	10.34 \pm 1.47	5.06 \pm 0.20	8.89 \pm 0.16	2.33 \pm 0.04	0.350	0.381 \pm 0.004	3.02 \pm 0.09	26.32 \pm 0.374	0.95
6	77.0 \pm 0.81	18.9 \pm 0.31	28.7 \pm 0.24	10.14 \pm 0.40	3.4 \pm 0.40	6.18 \pm 0.74	3.88 \pm 0.37	2.490	0.240 \pm 0.03	4.07 \pm 0.09	11.28 \pm 0.93	1.73
7	69.1 \pm 0.42	19.7 \pm 0.61	95.0 \pm 0.97	2.40 \pm 0.42	1.91 \pm 0.62	6.20 \pm 0.32	3.03 \pm 0.02	1.640	0.396 \pm 0.066	2.54 \pm 0.09	30.31 \pm 0.82	0.82
range	69.1–77.0	18.5–20.8	28.3–95.0	2.40–10.59	0.93–6.05	6.18–10.89	2.33–4.44	0.282–2.490	0.240–0.478	2.54–4.07	9.11–30.47	0.35–2.11

^a Analyses were done in triplicate; results are expressed as the mean \pm standard deviation.

Table 2. Correlation Coefficients between the Initial Compositional Parameters of Mackerel Mince Shown in Table 1,^a

	lipid	AA	TOH	Hb	total Fe	Fe-LMW	PUFAs	water	protein	Cu	Zn
fat	1.00	−0.20	0.01	−0.21	−0.32	−0.19	0.89*	−1.00	0.43	0.26	−0.69
AA	−0.20	1.00	0.77*	−0.17	−0.39	−0.30	0.01	0.23	0.13	−0.07	0.58
TOH	0.01	0.77*	1.00	0.05	−0.81*	−0.78*	0.37	0.01	0.28	0.54	0.12
Hb	−0.21	−0.17	0.05	1.00	0.03	−0.40	−0.25	0.16	0.23	0.23	−0.12
total Fe	−0.32	−0.39	−0.81*	0.03	1.00	0.91*	−0.65	0.29	−0.16	−0.85*	0.43
Fe-LMW	−0.04	−0.37	−0.79*	−0.52	0.83*	1.00	−0.34	0.04	−0.21	−0.78*	0.28
PUFAs	0.89*	0.01	0.37	−0.25	−0.65	−0.47	1.00	−0.86*	0.30	0.54	−0.66
water	−1.00*	0.23	0.01	0.16	0.29	−0.09	−0.86*	1.00	−0.49	−0.26	0.70
protein	0.43	0.13	0.28	0.23	−0.16	−0.08	0.30	−0.49	1.00	0.19	−0.16
Cu	0.26	−0.07	0.54	0.23	−0.85*	−0.88*	0.54	−0.26	0.19	1.00	−0.66
Zn	−0.69	0.58	0.12	−0.12	0.43	0.43	−0.66	0.70	−0.16	−0.66	1.00

^a Parameters marked with an asterisk (*) showed significant correlation ($p < 0.05$ and $n = 7$).

Table 3. Fatty Acid Profiles for All Batches of Mackerel Muscle Employed in the Oxidation Experiments^a

	percentage of fatty acids						
	batch 1	batch 2	batch 3	batch 4	batch 5	batch 6	batch 7
14:00	5.68 ± 0.30	3.20 ± 0.07	3.11 ± 0.11	7.85 ± 0.04	3.38 ± 0.10	2.11 ± 0.21	2.95 ± 0.30
16:00	16.04 ± 0.39	23.12 ± 0.08	22.93 ± 0.12	15.44 ± 0.18	23.43 ± 0.06	20.95 ± 0.45	21.08 ± 1.07
16:1 ω -7	2.90 ± 0.09	3.95 ± 0.07	4.01 ± 0.08	3.4 ± 0.01	5.49 ± 0.03	5.43 ± 0.22	6.10 ± 0.27
18:00	3.59 ± 0.22	5.09 ± 0.03	5.01 ± 0.10	3.17 ± 0.08	6.16 ± 0.07	5.94 ± 0.03	5.86 ± 0.04
18:1 ω -9	10.09 ± 0.70	19.11 ± 0.13	19.38 ± 0.48	8.89 ± 0.06	19.81 ± 0.51	14.61 ± 0.39	20.40 ± 0.30
18:1 ω -7	2.29 ± 0.07	3.84 ± 0.04	3.90 ± 0.05	1.97 ± 0.03	5.29 ± 0.13	5.39 ± 0.07	5.64 ± 0.03
18:2 ω -6	1.58 ± 0.11	1.30 ± 0.02	1.30 ± 0.04	1.81 ± 0.03	0.87 ± 0.03	0.86 ± 0.02	0.80 ± 0.04
18:3 ω -3	0.69 ± 0.02	1.20 ± 0.01	1.20 ± 0.05	0.96 ± 0.00	0.63 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.53 ± 0.01
20:1 ω -9	12.05 ± 0.56	1.70 ± 0.01	1.68 ± 0.04	13.06 ± 0.11	1.78 ± 0.05	2.07 ± 0.13	2.54 ± 0.11
18:4 ω -3	1.73 ± 0.07	2.71 ± 0.06	2.71 ± 0.14	2.56 ± 0.03	1.54 ± 0.06	0.84 ± 0.02	1.27 ± 0.04
20:4 ω -6	0.82 ± 0.04	1.22 ± 0.01	1.21 ± 0.02	0.79 ± 0.03	1.33 ± 0.03	1.48 ± 0.09	1.08 ± 0.05
22:1 ω -11	22.27 ± 1.38	0.88 ± 0.03	0.81 ± 0.05	25.47 ± 0.17	0.41 ± 0.03	2.92 ± 0.18	2.76 ± 0.22
22:1 ω -9	1.43 ± 0.05	0.40 ± 0.01	0.41 ± 0.01	1.28 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.42 ± 0.05	0.55 ± 0.06
20:4 ω -3	0.61 ± 0.02	1.46 ± 0.01	1.48 ± 0.05	0.62 ± 0.02	0.89 ± 0.03	0.56 ± 0.06	0.63 ± 0.01
20:5 ω -3	4.09 ± 0.22	9.46 ± 0.08	9.47 ± 0.03	3.85 ± 0.02	10.76 ± 0.19	13.24 ± 0.95	11.62 ± 0.55
24:1 ω -9	1.95 ± 0.05	1.03 ± 0.02	1.50 ± 0.04	0.72 ± 0.85	0.76 ± 0.03	0.48 ± 0.05	0.21 ± 0.01
22:5 ω -3	0.94 ± 0.04	1.81 ± 0.03	1.80 ± 0.01	0.87 ± 0.00	2.27 ± 0.03	2.21 ± 0.21	2.53 ± 0.21
22:6 ω -3	11.22 ± 0.89	18.50 ± 0.09	18.10 ± 0.39	7.30 ± 0.27	14.81 ± 0.38	20.05 ± 0.30	13.46 ± 0.93
saturated	25.31 ± 0.91	31.41 ± 0.18	31.01 ± 0.33	26.7 ± 0.30	32.97 ± 0.23	28.66 ± 0.69	29.89 ± 1.41
monounsaturated	52.99 ± 2.89	30.92 ± 0.31	31.64 ± 0.75	54.79 ± 1.24	33.94 ± 0.79	31.33 ± 1.06	38.19 ± 1.01
polyunsaturated	21.70 ± 1.41	37.62 ± 0.31	37.26 ± 0.74	18.76 ± 0.40	33.10 ± 0.79	39.67 ± 1.68	31.91 ± 1.84

^a Analyses were done in triplicate; results are expressed as the mean ± standard deviation.

the high percentages of 22:1 ω -11 and 20:1 ω -9 may be a seasonal parameter caused by dietary factors,⁴⁰ sexual maturation,³⁸ or differences in water temperature.^{41,42} As a general observation, palmitic acid (16:0) and docosahexaenoic acid (22:6 ω -3) followed by eicosapentaenoic acid (20:5 ω -3) were the most abundant saturated and polyunsaturated fatty acids, respectively, for all of the experiments (Table 3). The content of PUFAs exhibited a significant positive correlation with the lipid concentration.

The content of pro-oxidants and antioxidants also displayed significant variations among the different mackerel batches (Table 1). The initial concentrations of α -tocopherol (α -TOH) varied from 0.928 to 6.055 mg TOH/kg muscle. These values were in agreement with those previously reported for mackerel light muscle.⁴³ Although TOH is a lipophilic antioxidant, no

correlation was found with the total lipid content. Fish is unable to synthesize α -TOH, and it is accumulated from the diet,^{44,45} being influenced by factors such as seasonal period⁴⁶ and the age of the fish. As for the fish gender, no differences of α -TOH content have been previously reported between males and females of rainbow trout.⁴⁷ The concentration of ascorbic acid (AA) ranged between 2.40 and 10.59 mg AA/kg muscle, and these levels agreed with previous values found in the white muscle of mackerel.^{48,49} The levels of AA are also influenced by fish feeding.⁵⁰ Iglesias et al.⁴⁸ have reported that fatty species contained ratios of ascorbic acid (AA)/dehydroascorbic acid (DHAA) of <1, being significantly higher in muscle from lean fish species. The authors hypothesized that the greater proportion of DHAA, the primary oxidized product of AA, in pelagic fish

Table 4. Linear Correlations between the Initial Composition of Mackerel Muscle and Its Shelf-Life Referred to the Formation of Rancid Odors^a

	lipid	AA	TOH	Hb	total Fe	Fe-LMW	PUFA	water	protein	Cu	Zn
Pearson correlation	−0.76*	0.29	0.22	−0.18	−0.16	−0.09	−0.53	0.78*	−0.29	0.13	0.36

^aParameters marked with an asterisk (*) showed significant correlation ($p < 0.05$ and $n = 7$).

species can be attributed to their higher content in oxidizable substrates (PUFAs) and pro-oxidant substances as heme proteins. The levels of the endogenous antioxidants TOH and AA were found to be directly correlated. This correlation has been described previously in herring⁵¹ and could be attributed to the nutritional status of the fish.

The initial concentrations of hemoglobin and redox transition metals such as iron (Fe), copper (Cu), and zinc (Zn), which are potential initiators of lipid oxidation in fish muscle, have been also determined. The metals studied have been postulated as important elements involved in oxidative stress, as well as pro-oxidant and antioxidant agents. Pro-oxidant action of iron and copper occurs through multiple mechanisms as the Fenton-type reaction⁵² and peroxidase activity.⁵³ The antioxidant activity is essentially associated with the activity of the enzymes catalase (Fe) and superoxide dismutase (Fe, Zn, Cu). The concentration of hemoglobin varied largely from 6.18 to 10.89 $\mu\text{mol Hb/kg}$ muscle, in accordance with previous determinations in mackerel and herring light muscle.^{31,54} These levels of hemoglobin were found to be approximately 10–400 times higher than those found in lean fish species such as cod (0.03–0.23 $\mu\text{mol Hb/kg}$ muscle).³¹ The total content in Fe also displayed significant differences (2.41–4.44 mg Fe/kg muscle) among mackerel batches. Previous works showed an inverse relationship between size and iron content in fish species.⁵⁵ The low molecular weight iron (LMW-Fe), which was determined by difference between total iron and heme iron, represented around 10–66% of total iron found in mackerel muscle. These results were in concordance with previous results by Decker and Hultin in mackerel muscle.⁵⁶ A relevant feature is the negative relationship between TOH and the concentration of both total and free iron, suggesting that the pro-oxidant iron may act to decrease TOH levels. Iron and AA exhibited also a negative correlation, although it was not statistically significant. The total amount of copper was significantly lower and less variable than that of iron. Zinc ranged from 2.54 to 4.07 mg/kg muscle. Previous investigations on mackerel composition have shown a correlation between zinc content and age.⁵⁷

Relationship between Composition and Lipid Oxidation.

With the aim of study the relationship of compositional parameters with the onset of lipid oxidation, a data matrix was obtained from an array of chilled experiments. These results were analyzed by Pearson correlations and are shown in Table 4. For each experiment, the progress of oxidation was followed through the formation of the primary lipid oxidation products, lipid hydroperoxides, and the sensory detection of rancid odors. All chilled experiments developed oxidation in a variable time period ranging between 0.35 and 2.11 days. In all samples analyzed, the peroxide value of 0.70 mequiv/kg muscle granted the sensory detection of the incipient rancid off-odors and was used to determinate the shelf life period (Figure 1). Table 4 indicates the degree of linear relationship between the appearance of the incipient rancid off-odors expressed as shelf life (in days) and the constituents of mackerel muscle. Linear

regressions have been used before to study fish oxidation during chilled storage. Undeland et al.⁵⁸ found an almost linear relationship between the primary oxidation products, peroxides, and rancid odors during ice storage of herring fillets.⁵⁸ The same authors reported that linear models fit better than exponential models and were also able to explain high variation in the data corresponding to loss of α -tocopherol and other endogenous antioxidants present in herring muscle.

The onset of lipid oxidation showed a significant dependence on total lipid and water contents ($p < 0.05$). Figure 1 shows the lipid oxidation kinetics of three batches differing in fat content. The total amount of lipids and shelf life in terms of oxidation exhibited a negative linear relationship, and therefore, samples of mackerel mince having the highest values of total lipid reached the threshold value of peroxides earlier than samples with low values of total lipids. It seems that the lipid substrate is a crucial factor involved in the development of lipid oxidation. The onset of oxidation and water content showed a positive linear relationship, which can be explained by the strong inverse relationship between total lipid and water content (collinear variables) indicated above (Table 3). The total amount of PUFAs and protein also showed a strong linear correlation with shelf life, although it was not significant. In previous studies, Undeland et al.¹³ found that added triacylglycerols did not accelerate hemoglobin-mediated lipid oxidation in washed cod model system. These authors suggested that lipid oxidation in fatty fish may be more related to the quantity and type of the aqueous pro-oxidant and the membrane lipids (mainly formed by PUFAs), than to variations in total fat content. These conclusions were achieved in a model fish mince system in which total fat content was modulated by the addition of fish oil. The incorporation of these added triacylglycerols and their bioaccessibility to O_2 and pro-oxidant compounds present in fish muscle may differ from the state in the entire fish muscle. The same authors also suggested later that the use of fattier fish than cod could be more useful for washed minced model systems aimed at the study of oxidation kinetics of such species.³¹

Several works in muscle-based foods have shown that the kinetics of oxidation processes were closely associated with the pro-oxidative^{31,58,59} and antioxidative endogenous activities during ice storage.^{5,31,60} On the basis of linear regression analyses, the depletion of ascorbic acid was the chemical parameter most strongly correlated with the development of rancid odors in refrigerated fillets of herring.⁵⁸ Min et al.⁵ compared the susceptibility of meats from different animal species to lipid oxidation during storage at 4 °C. They concluded that the contents of myoglobin and the endogenous antioxidant capacities (ferric ion reducing capacity and radical scavenging activity) play the primary role for the differences in susceptibility of raw meats to lipid oxidation. In the present study, neither the initial concentration of ascorbic acid nor that of tocopherol calculated in the different batches of mackerel showed a significant linear correlation with the onset of lipid oxidation during refrigerated storage. With regard to the pro-oxidants, the initial

Table 5. Coefficients of the Multiple-Regression Model^a

	β	std error	regression coeff	std error	p level
intercept			8.305044	0.306585	0.001360
PUFAs	-1.45552	0.054058	-0.106385	0.003951	0.001377
total iron	-1.20174	0.056867	-0.934113	0.044204	0.002232
Hb	-0.56379	0.039025	-0.208919	0.014461	0.004757
AA	-0.26506	0.043024	-0.048015	0.007794	0.025350

^a The standardized regression coefficients (β) resulted from analyses in which all variables have been scaled to have a mean of 0 and a standard deviation of 1. The nonstandardized coefficients represent the regression parameters obtained from the analyses.

contents of hemoglobin or metals present in mackerel muscle were not linearly correlated with the appearance of off-odors during the chilled tests. Accordingly, ascorbic acid and tocopherol showed positive coefficients in agreement with their positive influence on the retardation of oxidation.

Multiple Regressions. Attempts to explain the onset of lipid oxidation considering the whole composition of mackerel were then performed by multivariate regression models. Multiple regression is a powerful tool commonly used for selecting the significant variables that explain the highest proportion of variance in many processes.⁶¹ Forward stepwise multivariate techniques were aimed to reveal the variables that could explain the susceptibility of the different groups of mackerel to lipid oxidation.

Table 5 shows the results of the forward stepwise multivariate regression. Coefficients were considered to be significantly different from zero at $p < 0.05$. The model contained variables having higher contribution to explain the susceptibility to lipid oxidation: the content of PUFAs followed by the contents of total iron, hemoglobin, and ascorbic acid, respectively. Although these independent variables were not significantly correlated with the shelf-life across Pearson coefficients, their combination resulted in outstanding values of $R^2 = 0.9975$, $F = 202.43$, and $p = 0.0049$. The resultant model obtained for the regression developed is described by the following equation:

$$\text{shelf life} = 8.305 - 1.06 \times \text{PUFAs} - 0.934 \\ \times \text{total iron} - 0.209 \times \text{Hb} - 0.048 \times \text{AA}$$

The regression technique introduced first the content in PUFAs, indicating its higher contribution as a predictor of shelf life. The amount of double bonds or PUFAs has shown a direct correlation with the oxidation rate.¹⁶ Total iron content was parameter with the second highest contribution in the model followed by hemoglobin. Ascorbic acid exhibited the lowest significant effect in the multicomponent model. The presence of this antioxidant in the model instead of α -tocopherol is in contrast with previous studies that observed a strong correlation of α -tocopherol degradation with the progress of lipid oxidation. This means that ascorbic acid is a more sensitive parameter for the first stages of oxidation. Previous works have shown that ascorbic acid was consumed in much earlier post-mortem stages.^{17,62}

Regression analysis is also widely used to estimate the conditional expectation of the dependent variable given by the independent variables. Multiple-regression equations have been proposed for predicting the shelf life of frozen fish muscle.⁶³ This study established a multiple-regression model that fits reasonably with the development of TBARs. The model was based on the potential of fish muscle lipids to be autoxidized at 60 °C (very related to the amount of PUFAs) and the content of pro-oxidants:

Table 6. Predicted versus Observed Shelf-Life Period of Chilled Minced Mackerel

expt	predicted	observed	% dev
1	2.079 ± 0.215	2.11	1.74
2	0.307 ± 0.182	0.35	14.00
3	1.734 ± 0.148	1.67	3.69
4	0.774 ± 0.232	0.76	1.81
5	0.975 ± 0.154	0.95	2.56
6	1.703 ± 0.225	1.73	1.58
7	0.839 ± 0.230	0.82	2.26

total iron and myoglobins or hemoglobins. The incorporation of the fat content into the model did not improve the regression coefficients obtained. These results are in agreement with ours, which revealed the importance of PUFA, ascorbic acid, and pro-oxidants in the susceptibility of chilled mackerel to oxidation.

Table 6 shows the experimentally observed versus predicted shelf lives by the linear regression model for the seven groups of chilled mackerel. The model resulted in shelf life deviations from predicted to experimental values ranging from 1.58 to 14%. Therefore, the model can be used to predict the chilled shelf life of minced mackerel with considerable accuracy.

In conclusion, these results emphasize the important role of the total content of polyunsaturated lipids in the susceptibility of a pelagic fish species such as mackerel to oxidation. Together with unsaturated lipids, the content of aqueous pro-oxidants, iron and hemoglobin, and the content of the ascorbic acid were the components showing major contributions to the explanation of such susceptibility. The accurate study of the kinetics of lipid oxidation in fish species together with multiple regression techniques offers a useful tool for predicting the shelf life of fish. Further work in this research will include the use of more complex, nonlinear modeling.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail maestre@iim.csic.es. Phone: +34 986 231930. Fax: +34 986 292762.

Funding Sources

This investigation has been supported by the Spanish Ministry of Science (AGL2009-12374-C03-01). The Spanish Ministry of Science and Xunta de Galicia are also gratefully acknowledged for the doctoral fellowship to R.M. and the postdoctoral contract "Eduardo Parga Pondal" to M.P., respectively.

REFERENCES

- (1) Ackman, R. G. *Marine Biogenic Lipids, Fats and Oils*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1989; Vol. II.
- (2) Lee, K. W.; Lip, G. Y. H. The role of omega-3 fatty acids in the secondary prevention of cardiovascular disease. *QJM* **2003**, 96 (7), 465–480.
- (3) Min, B.; Ahn, D. Factors in various fractions of meat homogenates that affect the oxidative stability of raw chicken breast and beef loin. *J. Food Sci.* **2009**, 74 (1), C41–C48.
- (4) Kilic, B.; Richards, M. P. Lipid oxidation in poultry Döner kebab: pro-oxidative and anti-oxidative factors. *J. Food Sci.* **2003**, 68 (2), 686–689.
- (5) Min, B.; Nam, K. C.; Cordray, J.; Ahn, D. U. Endogenous factors affecting oxidative stability of beef loin, pork loin, and chicken breast and thigh meats. *J. Food Sci.* **2008**, 73 (6), C439–C446.

- (6) Yancey, E. J.; Grobbel, J. P.; Dikeman, M. E.; Smith, J. S.; Hachmeister, K. A.; Chambers, E. C., IV; Gadgil, P.; Milliken, G. A.; Dressler, E. A. Effects of total iron, myoglobin, hemoglobin, and lipid oxidation of uncooked muscles on livery flavor development and volatiles of cooked beef steaks. *Meat Sci.* **2006**, *73* (4), 680–686.
- (7) Chen, C. C.; Pearson, A. M.; Gray, J. I.; Fooladi, M. H.; Ku, P. K. Some factors influencing the nonheme iron content of meat and its implications in oxidation. *J. Food Sci.* **1984**, *49* (2), 581–584.
- (8) Ackman, R. G.; Gunnlaugsdottir, H. Seafoods and fishery byproducts. Natural and unnatural environments for longer chain omega-3 fatty acids. In *Lipid Oxidation in Food*; Angelo, A. J. S., Ed.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 1992; pp 209–230.
- (9) Hamre, K.; Lie, O.; Sandnes, K. Seasonal development of nutrient composition, lipid oxidation and colour of fillets from Norwegian spring-spawning herring (*Clupea harengus* L.). *Food Chem.* **2003**, *82* (3), 441–446.
- (10) Szlinder-Richert, J.; Usydus, Z.; Wyszynski, M.; Adamczyk, M. Variation in fat content and fatty-acid composition of the Baltic herring *Clupea harengus* membras. *J. Fish Biol.* **2010**, *77* (3), 585–599.
- (11) Ozden, O. Micro, macro mineral and proximate composition of Atlantic bonito and horse mackerel: a monthly differentiation. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2005**, *40* (3), 578–586.
- (12) Tres, A.; Bou, R.; Codony, R.; Guardiola, F. Influence of different dietary doses of n-3- or n-6-rich vegetable fats and α -tocopheryl acetate supplementation on raw and cooked rabbit meat composition and oxidative stability. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (16), 7243–7253.
- (13) Undeland, I.; Hultin, H. O.; Richards, M. P. Added triacylglycerols do not hasten hemoglobin-mediated lipid oxidation in washed minced cod muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6847–6853.
- (14) Richards, M. P.; Hultin, H. O. Rancidity development in a fish model system as affected by phospholipids. *J. Food Lipids* **2001**, *8*, 215–230.
- (15) Wilson, B. R.; Pearson, A. M.; Shorland, F. B. Effect of total lipids and phospholipids on warmed-over flavor in red and white muscle from several species as measured by thiobarbituric acid analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 7–11.
- (16) Frankel, E. N. *Lipid Oxidation*; Oily Press: Dundee, Scotland, 1998.
- (17) Pazos, M.; Sánchez, L.; Medina, I. α -Tocopherol oxidation in fish muscle during chilling and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4000–4005.
- (18) Packer, J. E.; Slater, T. F.; Willson, R. L. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* **1979**, *278* (5706), 737–738.
- (19) Buettner, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *300* (2), 535–543.
- (20) Chen, Y. C.; Nguyen, J.; Semmens, K.; Beamer, S.; Jaczynski, J. Effects of dietary α -tocopheryl acetate on lipid oxidation and α -tocopherol content of novel omega-3-enhanced farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *LWT—Food Sci. Technol.* **2008**, *41* (2), 244–253.
- (21) European Union Council Regulation 103/76 of January 1976.
- (22) AOAC. Method 950.46. Moisture content in meat. In *Official Methods of Analysis*, 17th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD, 2002.
- (23) AOAC. Method 928.08. Protein content. In *Official Methods of Analysis*, 17th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD, 2002.
- (24) Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917.
- (25) Herbes, S. E.; Allen, C. P. Lipid quantification of freshwater invertebrates: method modification for microquantitation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1983**, *40* (8), 1315–1317.
- (26) Lepage, G.; Roy, C. C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.* **1986**, *27* (1), 114–120.
- (27) Burton, G. W.; Webb, A.; Ingold, K. U. A mild, rapid, and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. *Lipids* **1985**.
- (28) Pazos, M.; González, M. J.; Gallardo, J. M.; Torres, J. L.; Medina, I. Preservation of the endogenous antioxidant system of fish muscle by grape polyphenols during frozen storage. *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, *220*, 514–519.
- (29) Cabrini, L.; Landi, L.; Stefanelli, C.; Barzanti, V.; Anna Maria, S. Extraction of lipids and lipophilic antioxidants from fish tissues: a comparison among different methods. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Comp. Biochem.* **1992**, *101* (3), 383–386.
- (30) Iglesias, J.; González, M. J.; Medina, I. Determination of ascorbic and dehydroascorbic acid in lean and fatty fish species by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *223*, 781–786.
- (31) Larsson, K.; Almgren, A.; Undeland, I. Hemoglobin-mediated lipid oxidation and compositional characteristics of washed fish mince model systems made from cod (*Gadus morhua*), herring (*Clupea harengus*), and salmon (*Salmo salar*) muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (22), 9027–9035.
- (32) Brown, W. D. Chromatography of myoglobin on diethylaminoethyl cellulose columnas. *J. Biol. Chem.* **1961**, 2238–2240.
- (33) Richards, M. P.; Hultin, H. O. Effect of pH on lipid oxidation using trout hemolysate as a catalyst: a possible role for deoxyhemoglobin. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3141–3147.
- (34) AOAC. Official method 999.10. Lead, cadmium, zinc, copper and iron in foods. Atomic absorption spectrophotometry after microwave digestion. *Official Methods of Analysis*, 17th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD, 2003; Vol. 1–2.
- (35) Richards, M. P.; Kelleher, S. D.; Hultin, H. O. Effect of washing with or without antioxidants on quality retention of mackerel fillets during refrigerated and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4363–4371.
- (36) Chapman, R. A.; Mackay, K. The estimation of peroxides in fats and oils by ferric thiocyanate method. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1949**, *26*, 360–363.
- (37) Neter, J.; Wasserman, W.; Kutner, M. H. Applied linear regression models. Ed R Irwin: IL, 1983.
- (38) Wallace, P. D. Seasonal variation in fat content of mackerel (*Scomber scombrus* L.) caught in the western English Channel. *Fish. Res. Tech. Rep.* **1991**, 91.
- (39) Weihrach, J.; Son, Y.-S. Phospholipid content of foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1983**, *60* (12), 1971–1978.
- (40) Csengeri, I.; Farkas, T.; Majoros, F.; Olah, J.; Szalay, M. Effect of feeds on the FA composition of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquacult. Hung.* **1978**, *1*, 24–34.
- (41) Lovell, R. T. Nutrition of aquaculture species. *J. Anim. Sci.* **1991**, *69* (10), 4193–4200.
- (42) Henderson, R. J.; Tocher, D. R. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid Res.* **1987**, *26*, 281–347.
- (43) Pazos, M.; Sanchez, L.; Medina, I. α -Tocopherol oxidation in fish muscle during chilling and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (10), 4000–4005.
- (44) Bell, J. G.; McEvoy, J.; Tocher, D. R.; Sargent, J. R. Depletion of α -tocopherol and astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects autooxidative defense and fatty acid metabolism. *J. Nutr.* **2000**, *130* (7), 1800–1808.
- (45) Bai, S. C.; Gatlin, D. M. Dietary vitamin E concentration and duration of feeding affect tissue α -tocopherol concentrations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* **1993**, *113* (1–2), 129–135.
- (46) Deshapende, S. S.; Deshapende, U. S.; Salunkhe, D. K. Nutritional and health aspects of food antioxidants. In *Foods Antioxidants. Technological, Toxicological and Health Perspectives*; Madhavi, D. V., Deshapende, S. S., Eds.; Dekker: New York, 1996; pp 351–470.
- (47) López, M. C.; Satué, M. T.; González, M. L.; Agramont, A. α -Tocopherol content in trout oil. *Food Chem.* **1995**, *53* (1), 67–70.
- (48) Iglesias, J.; González, M. J.; Medina, I. Determination of ascorbic and dehydroascorbic acid in lean and fatty fish species by

high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, 223, 781–786.

(49) Petillo, D.; Hultin, H. O.; Krzynowek, J.; Autio, W. R. Kinetics of antioxidant loss in mackerel light and dark muscle. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 4128–4137.

(50) Sealey, W. M.; Gatlin, D. M., III. Dietary vitamin C and vitamin E interact to influence growth and tissue composition of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) but have limited effects on immune responses. *J. Nutr.* **2002**, 132 (4), 748–755.

(51) Hamre, K.; Lie, Ø.; Sandnes, K. Seasonal development of nutrient composition, lipid oxidation and colour of fillets from Norwegian spring-spawning herring (*Clupea harengus* L.). *Food Chem.* **2003**, 82 (3), 441–446.

(52) Stohs, S. J.; Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biol. Med.* **1995**, 18 (2), 321–336.

(53) Fang, W.-C.; Kao, C. H. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. *Plant Sci.* **2000**, 158 (1–2), 71–76.

(54) Richards, M. P.; Hultin, H. O. Contribution of blood and blood components to lipid oxidation in fish muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 555–564.

(55) Cowx, I. G. Concentrations of heavy metals in the tissues of trout *Salmo trutta* and char *Salvelinus alpinus* from two lakes in North Wales. *Environ. Pollut. Ser. A, Ecol. Biol.* **1982**, 29 (2), 101–110.

(56) Decker, E. A.; Hultin, H. O. Factors influencing catalysis of lipid oxidation by the soluble fraction of mackerel muscle. *J. Food Sci.* **1990**, 55, 947–950.

(57) Papadopoulou, C.; Kanas, G. D.; Moraitopoulou Kassimati, E. Zinc content in otoliths of mackerel from the Aegean. *Mar. Pollut. Bull.* **1978**, 9 (4), 106–108.

(58) Undeland, I.; Hall, G.; Lingnert, H. Lipid oxidation in fillets of herring (*Clupea harengus*) during ice storage. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47 (2), 524–532.

(59) Undeland, I.; Ekstrand, B.; Lingnert, H. Lipid oxidation in herring (*Clupea harengus*) light muscle, dark muscle, and skin, stored separately or as intact fillets. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, 75 (5), 581–590.

(60) Kishowar, J.; Alistair, P.; Corinne, M. S. Fatty acid composition, antioxidants and lipid oxidation in chicken breasts from different production regimes. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2004**, 39 (4), 443–453.

(61) Krener, P. G.; Abramowitz, S. I. Prediction of videotelemetry productivity from clinical screening parameters. *J. Am. Acad. Child Psychiatry* **1985**, 24 (5), 597–602.

(62) Iglesias, J.; Pazos, M.; Andersen, M. L.; Skibsted, L. H.; Medina, I. Caffeic acid as antioxidant in fish muscle: mechanism of synergism with endogenous ascorbic acid and α -tocopherol. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57 (2), 675–681.

(63) Kurade, S. A.; Baranowski, J. D. Prediction of shelf-life of frozen minced fish in terms of oxidative rancidity as measured by TBARS number. *J. Food Sci.* **1987**, 52 (2), 300–302.

CAPÍTULO 4

**PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA
SUSCEPTIBILIDAD A DESARROLLAR OXIDACIÓN
LIPÍDICA EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS QUE
CONTIENEN PESCADO Y DERIVADOS DE LA PESCA**

4. PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD A DESARROLLAR OXIDACIÓN LIPÍDICA EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS QUE CONTIENEN PESCADO Y DERIVADOS DE LA PESCA.

4.1 Introducción

La alta inestabilidad del músculo de pescado y de productos derivados de la pesca perjudica dramáticamente su conservación y explotación comercial. La oxidación lipídica y el crecimiento microbiano son los principales procesos que reducen la vida útil de este tipo de productos. Tradicionalmente, el cálculo de la vida comercial del pescado y productos derivados de la pesca se ha basado en predecir el crecimiento microbiano de los SSO (Spoilage Specific Organisms), que son un grupo de bacterias que provocan la aparición de sabores y olores desagradables en el pescado. Cuando el pescado muere, su sistema inmunológico se colapsa y las bacterias comienzan a crecer libremente. El aumento en el número de bacterias también aumenta los productos de degradación derivados de su metabolismo como el TMA, H_2S , CH_3SH y $(CH_3)_2S$, deteriorando las propiedades organolépticas del producto final (11). Las ecuaciones desarrolladas para modelizar el crecimiento de bacterias han sido utilizadas con éxito en la predicción de la vida media en pescado fresco. Sin embargo, el análisis sensorial sigue siendo la mejor manera para determinar el tiempo de rechazo. Recientemente se ha desarrollado una aplicación informática que combina el crecimiento microbiano con un análisis sensorial para predecir la vida útil del pescado (224). No obstante, el crecimiento microbiano puede detenerse cuando el almacenamiento se realiza a muy baja temperatura, como es el caso de la ultracongelación.

El desarrollo de la oxidación lipídica, principalmente durante su almacenamiento congelado, es el principal problema en la explotación comercial de especies de pescado grasas y semigrasas (218). La aparición de aromas asociados a la rancidez en estas especies es generalmente más rápido que el asociado al crecimiento microbiano. No obstante, no se han desarrollado muchos trabajos donde se asocie la oxidación lipídica a la vida útil del pescado o producto pesquero. El uso de sensores químicos que miden el deterioro oxidativo ha sido propuesto para determinar el final de la vida útil comercial del pescado y productos derivados de la pesca (225, 226). Sin embargo, los datos obtenidos son a tiempo real y no tienen valor predictivo, por lo que solo sirven para detectar el final de la vida útil del producto.

El objetivo de esta parte de la memoria consistió en desarrollar una primera aproximación a un modelo que reproduzca el desarrollo de la oxidación lipídica, con la finalidad de poder predecir la vida útil en pescado o un producto derivado de la pesca y el efecto que los antioxidantes polifenólicos ejercerán sobre esta vida útil. Para alcanzar dicho propósito, la composición inicial y la evolución de la oxidación lipídica de una serie de experimentos fueron determinadas. Dichos datos fueron utilizados por un algoritmo capaz de determinar las pseudo-constantes cinéticas de las distintas reacciones involucradas en el proceso de oxidación lipídica, las cuales se aplicaron a un modelo matemático capaz de predecir la vida útil comercial y predecir la cantidad de aditivo antioxidante necesario para obtener una vida útil comercial predeterminada de un producto pesquero en base a su composición inicial.

4.2 PATENTE

Procedimiento para determinar la susceptibilidad a desarrollar
oxidación lipídica en productos alimenticios que contienen
ácidos grasos insaturados

Rodrigo Maestre, Manuel Pazos, and Isabel Medina



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201131443	
Fecha de recepción:	02 septiembre 2011, 10:31 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	408	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD A DESARROLLAR OXIDACIÓN LIPÍDICA EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS QUE CONTIENEN ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS.	
Documentos enviados:	Descripcion.pdf (30 p.) Reivindicaciones.pdf (5 p.) Resumen.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=NOMBRE UNGRIA LOPEZ JAVIER - NIF 05211582N,OU=500050022,OU=FNMT Clase 2 CA,O=FNMT,C=ES	
Fecha y hora de recepción:	02 septiembre 2011, 10:32 (CEST)	
Codificación del envío:	58:18:86:AB:31:94:A4:FD:28:5E:CB:BD:6A:27:9A:40:46:5A:07:54	

/Madrid, Oficina Receptora/

**PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD A
DESARROLLAR OXIDACIÓN LIPÍDICA EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS
QUE CONTIENEN ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS**

La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la susceptibilidad de una muestra o lote de alimentos, que contienen ácidos grasos insaturados, almacenados a una temperatura constante, a degradarse por el desarrollo de la oxidación lipídica, que comprende: determinar las distintas pseudo-constantes cinéticas K asociadas a la oxidación para cada uno de los parámetros medidos, mediante un algoritmo; caracterizar la composición inicial de una muestra del alimento a partir de los parámetros relacionados con dicha oxidación y calcular la susceptibilidad a oxidarse de dicho alimento. El procedimiento descrito permite además determinar la vida útil comercial de una muestra de alimento o lote de alimentos que se quiera comercializar, así como la cantidad mínima de aditivos antioxidantes que pueden añadirse al mismo para alargar dicha vida comercial un tiempo predeterminado, partiendo de los resultados obtenidos en dicho procedimiento.

**PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD A
DESARROLLAR OXIDACIÓN LIPÍDICA EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS QUE
CONTIENEN ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS**

SECTOR DE LA TÉCNICA

5 La presente invención se enmarca en el sector de la Industria
alimentaria, concretamente en el campo de la conservación de
alimentos, y más concretamente en el diseño y aplicación de
procedimientos dirigidos a determinar la susceptibilidad de
productos alimenticios que contiene ácidos grasos
10 insaturados, como son los productos pesqueros o derivados de
la pesca, especialmente aquellos que incorporan aditivos,
para poder optimizar la conservación y preparación de dichos
alimentos así como para predecir su vida comercial
conservando una calidad organoléptica y nutricional óptima de
15 cara a su venta y comercialización.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El pescado está considerado como uno de los alimentos de
origen animal con mayor interés nutricional, debido
mayoritariamente, a la presencia de ácidos grasos ω -3
20 poliinsaturados como el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω -
3) y docosahexaenoico (DHA, 22:6 ω -3) (Ackman R.G. 1989.
Marine biogenic lipids, fats and oil. CRC Press, Boca Ratón,
Florida). Estos ácidos grasos son considerados compuestos
funcionales, ya que su consumo está asociado a la prevención
25 de enfermedades, principalmente cardiovasculares (Bang HO,
Dyerberg J, Nielsen AB. Plasma lipid and lipoprotein pattern
in Greenlandic West-coast Eskimos. Lancet 1971; 1
(7710):1143-5).

Sin embargo, la estabilidad de este producto durante su
30 almacenamiento, y por tanto su conservación y
comercialización, se ve dramáticamente perjudicada por dos
razones principales: el alto contenido del pescado en ácidos
grasos poliinsaturados (PUFAs), susceptibles a desarrollar
rancidez oxidativa, y la idoneidad del pescado como sustrato
35 para el crecimiento microbiológico. Por tanto, el crecimiento

microbiológico y la degradación de los PUFAs son los principales problemas a los que se enfrenta la explotación comercial de especies de pescado (Hsieh, R. Kinsella, 1989 *J. Adv Food Nutr Res. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanism, products and inhibition with emphasis on fish*).

El músculo de pescado vivo o recién capturado es estéril, debido a que el sistema inmunológico del pez previene el crecimiento de las bacterias en el músculo. Sin embargo, cuando el pescado muere, el sistema inmunológico se colapsa y las bacterias proliferan libremente. El aumento en la población de bacterias aumenta también la cantidad de productos derivados de su metabolismo, como el TMA, H_2S , CH_3SH y $(CH_3)_2S$, que deterioran sus propiedades organolépticas (H.H. Huss. El pescado Fresco: Su calidad y cambios en su calidad, FAO documento técnico de pesca 348, 1998). Los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos del pescado pueden sufrir una serie de reacciones radicalarias que facilitan la reacción con el oxígeno para formar hidroperóxidos lipídicos. Estos hidroperóxidos, a su vez se descomponen en radicales libres, activando reacciones radicalarias en cadena que generan nuevos hidroperóxidos y productos finales responsables de la aparición de olores asociados a la rancidez como alcoholes, aldehídos y cetonas. De manera general, el deterioro organoléptico es el que marca la vida comercial del pescado y los productos derivados de la pesca.

El cálculo de la vida comercial del pescado y productos derivados de la pesca se ha basado tradicionalmente en la predicción de crecimiento microbiano, y más concretamente de los SSO (*Spoilage Specific Organisms*). Los SSO son un grupo de bacterias que provocan la aparición de sabores y olores desagradables en el pescado. Además, el incremento de la carga microbiana tanto de bacterias autóctonas (*Clostridium botulinum*, *Vibrio sp.*, *V. Cholerae*, *V. Parahemolyticus* o *Listeria monocytogenes* entre otros), como de bacterias no

autóctonas (*Salmonella sp.*, *Shigella*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*) (H.H. Huss, 1997. Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. FAO documentos técnico de pesca 334, 1997) presentes en el pescado, puede representar un grave riesgo para la salud pública en el caso de que sean ingeridos. Los modelos desarrollados para crecimiento de bacterias han sido usados con éxito en la predicción de la vida media en pescado fresco. Sin embargo, el análisis sensorial sigue siendo la mejor manera de determinar el tiempo de rechazo. Teniendo en cuenta este hecho, se han desarrollado aplicaciones informáticas que pueden predecir la vida útil del pescado en base a su crecimiento microbiano y a un análisis sensorial (Nuim, M.; Alfaro, B.; Cruz, Z.; Argarate, N.; George, S; Yvan, L.M.; Olley, J.; Pin, C.; Modelling spolaige of fresh turbot and evaluation of a time-temperature integrator (TTI) label under fluctuating temperature. *International Journal of Food Microbiology*. 173; 3; 193-199). No obstante, el crecimiento microbiano puede detenerse cuando el almacenamiento se realiza a muy bajas temperaturas, como en el caso de la congelación.

La oxidación lipídica es otro proceso íntimamente ligado a la vida comercial del pescado. La aparición de aromas asociados a la rancidez, principalmente durante su almacenamiento congelado, es el principal problema al que se enfrenta la explotación comercial de especies de pescado grasas y semigrasas. (Hsieh, R. Kinsella, 1989 J. Adv Food Nutr Res *Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanism, products and inhibition with emphasis on fish*). Para estas especies, el deterioro de las propiedades organolépticas debido a la oxidación lipídica es generalmente más rápido que el asociado al crecimiento microbiano. Sin embargo, no son tan numerosos los trabajos donde se asocia la vida útil a la oxidación lipídica, y más concretamente, los estudios que tienen por objeto predecir la velocidad y extensión de la oxidación lipídica. El uso de sensores

químicos para determinar el final de la vida comercial del pescado, basándose en el deterioro oxidativo, ha sido el área más ampliamente estudiada (Haugen, J.E.; Undeland, I.; Lipid Oxidation in Herring Fillets (*Clupea harengus*) during ice storage measured by a commercial hybrid gas-sensor array system. J. Agric. Food. Chem, 2003, 51(3), 752-759) en el campo del cálculo de la vida media del pescado y productos derivados de la pesca. No obstante, la medida de estos instrumentos no es predictiva sino que se realiza en tiempo real, y lleva asociado errores de ± 1 día en la medida de la vida comercial de producto. Por lo tanto, la tecnología basada en sensores químicos no es útil para predecir sino que solo sirve para detectar el final de la vida útil.

La legislación actual (Orden de 2 de agosto de 1991 por la que se establecen las normas microbiológicas de los diferentes productos de la pesca y acuicultura, así como los límites del contenido en metales pesados y los métodos analíticos para la determinación de éstos; BOE 15/08/1991), establece los límites microbiológicos para prevenir una intoxicación alimentaria, debido a que la elevada presencia de determinadas bacterias o de toxinas sintetizadas por éstas, que pueden provocar un grave problema para la salud. Sin embargo, aunque los productos resultantes de la oxidación lipídica son potencialmente tóxicos, la cantidad de éstos que podemos encontrar en un alimento es incapaz de provocar una intoxicación alimentaria. De ahí que los modelos existentes para predecir la vida comercial de los productos pesqueros y derivados de la pesca, se hayan basado exclusivamente en el crecimiento microbiano, si bien el deterioro de los lípidos pueda aparecer antes. Además, se debe de tener en cuenta que el proceso de congelación consigue detener completamente el crecimiento microbiano. Sin embargo, el proceso de congelación es incapaz de detener el desarrollo de la oxidación lipídica; sólo es capaz de ralentizarlo. Por ello, la estimación de la vida útil basada en parámetros

microbiológicos, especialmente en pescados grasos (grupo de pescados que contiene más de un 5% de grasa) y semigrasos (contienen entre un 2% y un 5% de grasa), puede no ser la más adecuada. Además, la presencia en el mercado de productos ya
5 estropeados, debido a una estimación incorrecta de la vida útil de un producto, puede provocar un importante perjuicio económico a la imagen de la empresa.

La capacidad y velocidad de un producto a desarrollar oxidación lipídica depende de un gran número de factores
10 intrínsecos, entre los que podemos citar el número de instauraciones de los ácidos grasos (Frankel E. N, (1998) *Lipid oxidation. The oily Press*, Dundee, Scotland) y la presencia o ausencia de activadores e inhibidores de la oxidación localizados en el propio tejido (Angelo, A. J. St.,
15 *Lipid oxidation in Food, ACS symposium series*. 1992), así como de factores extrínsecos como son la temperatura o la cantidad de oxígeno. El desarrollo de la oxidación lipídica, además de provocar aromas y sabores asociados a la rancidez, también promueve cambios en la textura, color y pérdida de
20 propiedades nutricionales del músculo. Los peróxidos, carbonilos y aldehídos lipídicos formados son capaces de reaccionar con vitaminas, aminoácidos y proteínas, provocando la pérdida de compuestos con alto valor nutricional, cambio de color del músculo y disminución de la capacidad de
25 retención de agua del músculo. Actualmente, las condiciones de congelación y almacenamiento del músculo de pescado grasos empleadas por la industria pueden retardar pero no detener el desarrollo de la rancidez (Richards, M.P.; Kellerher, S.; Hultin, H.o. *Effect of washing with and without antioxidants*
30 *on quality retention of Mackerel fillets Turing refrigerated and frozen storage*, *J. Agric. Food. Chem.* 1998, 46(10), 4363-4371).

El pescado y los productos derivados de la pesca no son los únicos productos alimenticios que pueden desarrollar
35 rancidez oxidativa. Un gran número de alimentos que contienen

PUFAs, por ejemplo aquellos que están parcial o totalmente emulsionados con aceites ricos en PUFAs como son leches, natas, quesos, mayonesas, helados, sopas, salsas o alimentos infantiles, tienen su vida útil comercial limitada por el desarrollo de la oxidación lipídica.

La estrategia más ampliamente utilizada para evitar el deterioro de alimentos ricos en PUFAs provocado por la oxidación lipídica es el uso de aditivos antioxidantes. Estos compuestos son capaces de disminuir considerablemente el deterioro del músculo inducido por los productos de degradación de los lípidos. El uso de antioxidantes sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT) y el butilhidroxianisol (BHA) ha sido una práctica muy común durante los últimos años. Sin embargo, la normativa internacional tiende a restringir su uso, y en concreto, la UE prohíbe su utilización en alimentos infantiles y aceites envasados, ya que, hay estudios que muestran efectos cancerígenos cuando son empleados en altas concentraciones (Ito y cols., *J. Natl. Cancer Inst.* 70, 343). En los últimos años, el uso de compuestos naturales como aditivos antioxidantes se ha extendido a la industria alimentaria. Los compuestos fenólicos naturales se encuentran entre los compuestos naturales más citados (Shahidi and Naczk, 1995, *Food Phenolics: sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing company Inc, USA*). Además de su potencial uso como aditivo alimentario, a estos compuestos se les atribuyen efectos beneficiosos para la salud.

Aunque se han desarrollado ecuaciones matemáticas que modelizan la evolución de la oxidación lipídica e incluso tienen en cuenta la presencia de antioxidantes de naturaleza fenólica (Murado, M. A.; Vázquez, J. A., *Mathematical Model for the Characterization and Objective Comparison of Antioxidant Activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, (3), 1622-1629) (Barretto, A. C. S.; Ida, E. I.; Silva, R. S. F.; Torres, E. A. F. S.; Shimokomaki, M.;

Empirical models for describing poultry meat lipid oxidation inhibition by natural antioxidants; Journal of Food Composition and Analysis Volume 16, Issue 5, 587-594), estos modelos presentan una serie de limitaciones:

- 5 • Los modelos que se obtienen reproducen la aparición de compuestos de degradación asociados a la oxidación lipídica pero no predicen, por lo que no resuelve la problemática planteada;
- 10 • Se trata de modelos estadísticos y no mecanísticos, por lo que los resultados obtenidos en el sistema en el que se han desarrollado no son extrapolables a otros sistemas;
- 15 • No tienen en cuenta la composición inicial de la muestra, ya que se ha observado que ésta puede influir significativamente en el desarrollo de la oxidación (Rodrigo Maestre, Manuel Pazos and Isabel Medina: Role of the Raw Composition of Pelagic Fish Muscle on the Development of Lipid Oxidation and Rancidity during Storage; *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59 (11), pp 6284-20 629);
- No incluyen un análisis sensorial, imprescindible para poder determinar el final de la vida útil comercial del mismo.

25 Por ello se hace imprescindible en la industria alimentaria el desarrollo de nuevos procedimientos capaces de predecir el nivel de degradación de un alimento que contiene ácidos grasos insaturados, como son principalmente (aunque no exclusivamente) los productos pesqueros y derivados de la
 30 pesca, mediante la determinación de su susceptibilidad a desarrollar oxidación lipídica, estando dichos procedimientos basados en la composición inicial del producto y pudiendo incluir la presencia de aditivos antioxidantes para su conservación. Esto permite determinar la vida comercial de
 35 este tipo de productos alimenticios, y adicionalmente poder

determinar la cantidad óptima de aditivo antioxidante que puede emplearse en un alimento para aumentar su periodo de conservación.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Descripción breve

El objeto principal de la presente invención está constituido por un procedimiento capaz de predecir y determinar la susceptibilidad de una muestra de alimento que presenta un contenido igual o mayor al 0,25% en ácidos grasos insaturados almacenado a una temperatura constante a degradarse por el desarrollo de la oxidación lipídica que experimenta el producto.

Dicho procedimiento comprende, al menos, las siguientes etapas:

- 15 a) determinar la composición inicial de al menos 10 muestras de distintos lotes del alimento en relación con los siguientes parámetros relacionados con la oxidación lipídica: concentración de sustrato oxidable, concentración de antioxidantes endógenos, concentración de prooxidantes endógenos, y opcionalmente de al menos la concentración de un aditivo con propiedades antioxidantes añadido a las muestras (también llamados en esta memoria antioxidantes exógenos);
- 20 b) medir periódicamente la concentración de hidroperóxidos en cada muestra de alimento almacenado a temperatura constante, y realizar simultáneamente un análisis sensorial del nivel de rancidez olfativa de la misma para determinar el fin de la medida de hidroperóxidos lipídicos, que será cuando se detecte un incipiente olor a rancio;
- 30 c) calcular la pseudo-constante cinética K de cada parámetro medido en la primera etapa, relacionada con el desarrollo de la oxidación lipídica, mediante un algoritmo que minimiza el cuadrado de la diferencia entre el valor de hidroperóxidos medido de forma

periódica en la etapa anterior y un valor de hidroperóxidos predicho en un momento t mediante la siguiente ecuación (1), a partir de unos valores de k preasignados:

$$[LOOH] = [LOOH]_0 \times e^{t \times A} \quad (\text{ecuación 1})$$

donde

$[LOOH]$ = concentración de hidroperóxidos predicha a tiempo t ;

$[LOOH]_0$ = concentración inicial de hidroperóxidos medida a tiempo 0;

t = tiempo; y

A se obtiene de la ecuación (2):

$$A = K_{n+1} \times [Sustrato] \times \left(\frac{K_1 \times [Proox]_1 + \dots + [Proox]_n \times K_n}{[Antiox]_{n+2} \times K_{n+2} + \dots + [Antiox]_{n+2+m} \times K_{n+2+m} + [Antiox-A]_{n+3+m} \times K_{n+3+m}} \right) -$$

$$[Proox]_1 \times K_n - \dots - [Proox]_n \times K_n$$

donde

K = pseudo-constante cinética de reacción por oxidación lipídica del alimento

$[Sust]$ = concentración de sustrato oxidable

$[Proox]$ = concentración de prooxidantes endógenos presentes en la muestra

$[Antiox]$ = concentración de antioxidantes endógenos presentes en la muestra

$[Antiox-A]$ = concentración de aditivo con propiedades antioxidantes añadido al alimento; y

- d) analizar la composición inicial de una nueva muestra o lote del alimento, de acuerdo con los parámetros medidos anteriormente, y calcular el parámetro A de la ecuación (2), con las pseudo-constantes obtenidas en el paso anterior y con los datos de la composición inicial de la nueva muestra o lote, que refleja la susceptibilidad a oxidarse del alimento.

Básicamente, la invención principal se basa en caracterizar la composición inicial de diferentes muestras de un alimento en relación con diferentes parámetros ligados a la oxidación lipídica, además de medir experimentalmente la evolución de la concentración de hidroperóxidos lipídicos de dichas muestras de alimento hasta que se detecta sensorialmente un incipiente olor a rancio. Dichos datos se aplican a una ecuación basada en los mecanismos de la reacción de oxidación lipídica que experimenta el producto, permitiendo conocer así la susceptibilidad del producto a la degradación. Se entiende que un alimento de estas características no sería adquirido cuando sensorialmente se detecta un incipiente olor a rancio.

En principio, en la primera etapa a) se toman y analizan como mínimo 10 muestras de distintos lotes del alimento para caracterizar su composición inicial. Las muestras del producto alimenticio con las que se quiere determinar las distintas K deben presentar una variabilidad en su composición inicial que sea representativa de las distintas composiciones/formulaciones que presenta dicho producto en el mercado. De este modo, se entiende por "muestra del alimento" en el ámbito de la presente invención a una muestra extraída de una sola pieza del alimento, o en su defecto de dos o más piezas diferentes del producto que se mezclan para conformar una única muestra a caracterizar. En este caso, la muestra de varias piezas del producto se tritura o mezcla bien (ya sea sólido o líquido) para tenerlo bien homogéneo.

De cada muestra del alimento se tomarán diferentes alícuotas, una por cada parámetro, para ser analizadas de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en el campo, de tal forma que cada parámetro será medido por triplicado. También se tomarán alícuotas cada vez que se midan los hidroperóxidos lipídicos presentes en la muestra.

Con respecto a la etapa b), cabe indicar que la medida periódica de hidroperóxidos lipídicos en la muestra se puede

realizar por métodos convencionales conocidos en el campo, aunque preferiblemente se realiza mediante la reacción de Fe^{+2} con los hidroperóxidos presentes en un extracto lipídico de dicha muestra (Chapman, R. A.; Mackay, K., *The estimation of peroxides in fats and oils by ferric thiocyanate method*. J. Am. Oil Chem. Soc 1949, 26, 360-363). La frecuencia de la medida periódica, tanto de la concentración de hidroperóxidos como de la rancidez olfativa correspondiente depende del tipo de muestra de alimento (su composición) y de la temperatura de almacenamiento del mismo. En muestras congeladas y ultracongeladas, la periodicidad es mayor que en refrigerado.

El análisis sensorial que se realiza para determinar el final de la etapa b) del procedimiento se realiza sobre la misma alícuota utilizada para medir el valor de hidroperóxidos, con objeto de determinar cuándo debe dejarse de realizar la medida de hidroperóxidos porque se ha alcanzado un grado de oxidación suficiente. Dicho análisis sensorial puede realizarse de manera preferida con un panel de cata especializado de más de un panelista, por ejemplo de al menos 4 panelistas, sin ser este número determinante para la invención (J.B. Rossell, "Measurements of rancidity", in *Rancidity in Foods, 2nd Edition, Elsevier Science Publishers Ltd* (1989)).

La ecuación (1) de la etapa c) se obtuvo tomando como referencia trabajos donde se estudian las cinéticas de la oxidación de los lípidos en alimentos (Labuza, T. P.; Dugan, L. R., *Kinetics of lipid oxidation in foods*. C R C Critical Reviews in Food Technology 1971, 2, (3), 355 - 405).

El algoritmo para calcular las pseudo-constantes cinéticas K de reacción del alimento por oxidación lipídica asociadas a los parámetros medidos se ejecuta mediante un programa informático diseñado para tal fin. En una realización, el algoritmo de optimización es creado en Matlab®, donde una función crea un valor aleatorio para cada una de las pseudo-constantes cinéticas y se utiliza la

función "*fminsearch*" que va modificando el valor de las distintas pseudo-constantes hasta que alcanza el óptimo. En otra realización de la invención, los valores de *K* se preasignan a voluntad del usuario, de tal forma que el protocolo va posteriormente modificando dichos valores de *K* preasignados hasta que se minimiza la diferencia por mínimos cuadrados.

De acuerdo con la presente invención, el desarrollo de un procedimiento para determinar la susceptibilidad oxidativa de un alimento que contiene ácidos grasos insaturados se fundamenta en los siguientes factores:

- Determinar la susceptibilidad a la oxidación del sustrato oxidable presente en un tipo de muestra alimentaria, a partir de su composición inicial.
- Determinar el efecto catalítico de compuestos prooxidantes presentes en un tipo de muestra del alimento.
- Determinar la inhibición de la oxidación provocada por compuestos antioxidantes presentes en un tipo de muestra, tanto endógenos como exógenos (añadidos).

El procedimiento aquí descrito resuelve las limitaciones anteriormente planteadas de la siguiente manera:

- El procedimiento permite determinar la susceptibilidad de un sustrato a desarrollar oxidación lipídica, y puede ser usado para predecir y no modelizar, como se hacía hasta ahora en el campo.
- El presente procedimiento está basado en un modelo mecanístico, por lo que es posible extrapolarlo a otros sistemas lipídicos.

Además, el procedimiento descrito es simple y puede ser informatizado.

Como se ha dicho, el parámetro que refleja la susceptibilidad del producto a sufrir oxidación lipídica es el parámetro *A* de la ecuación (2). Este parámetro, si es

determinado en una muestra o muestras representativas de un lote de alimentos, puede usarse por ejemplo para comparar distintas muestras o lotes de un mismo alimento, almacenados bajo las mismas condiciones de temperatura.

5 Como resultado de la aplicación de este procedimiento, se puede conseguir optimizar el transporte y distribución de alimentos que contienen ácidos grasos insaturados, especialmente aunque no de manera limitada de productos procedentes de la pesca y de la acuicultura, basándose en los
10 datos de susceptibilidad a la oxidación lipídica que se consiguen con el procedimiento anterior, y que como se verá, es fundamental para predecir los periodos de vida útil comercial del producto.

Descripción detallada

15 Como se ha dicho, el procedimiento se aplica a alimentos que se encuentran conservados y almacenados a una temperatura constante, es decir, sin variaciones de temperatura que puedan provocar una aceleración o una ralentización de la reacción de oxidación. Preferentemente, el alimento puede
20 estar almacenado a una temperatura comprendida entre 25°C y -50°C, incluidos ambos límites. En una realización particular, la temperatura constante de almacenamiento está comprendida entre 15°C y 25°C, incluidos ambos límites. En otra realización particular de la invención, el procedimiento
25 puede ser utilizado tanto para productos refrigerados (almacenados entre 0°C y 14°C, incluidos ambos límites), como congelados (-20°C y -1°C, incluidos ambos límites) o ultracongelados (-50°C y -21°C, incluidos ambos límites), siempre que se mantenga constante la T^a de almacenamiento,
30 obteniendo los mejores resultados en productos ultracongelados. Aunque el procedimiento es igualmente válido para cualquiera de estos tipos de almacenamiento de productos, se ha comprobado que a medida que disminuye la temperatura de almacenamiento, el procedimiento proporciona
35 mejores resultados. Esto significa que la determinación de la

susceptibilidad a la oxidación es más exacta para un producto almacenado congelado comparado con el almacenado refrigerado, y que para el ultracongelado respecto al congelado y refrigerado.

5 La presente invención tal cual se describe en el apartado anterior puede aplicarse a todo tipo de alimentos que contienen más de 0,25% de ácidos grasos insaturados. Estos productos alimenticios son por ejemplo pescado, leches, natas, quesos, mayonesas, helados, sopas, salsas o alimentos
10 infantiles, sin ser esta lista limitativa de la invención. En una realización, es un alimento al que se le han añadido ácidos grasos insaturados (donde el producto final presenta un contenido mayor al 0,25% en ácidos grasos insaturados), por ejemplo que están parcial o totalmente emulsionados con
15 aceites ricos en PUFAs; éste puede ser el caso de los productos lácteos mencionados, los helados, las sopas o salsas...

El procedimiento está preferentemente (pero no limitativamente) diseñado para productos procedentes de la
20 pesca y la acuicultura, es decir para productos pesqueros (pescado entero, fileteado o triturado, entre otras presentaciones) o derivados de la pesca (todo aquel subproducto obtenido a partir del pescado, como aceites o harinas de pescado entre otros). Más preferentemente todavía,
25 el producto pesquero es un pescado azul, y en un caso particular se encuentra almacenado ultracongelado.

Como se deriva del procedimiento descrito en el apartado anterior y de la ecuación (2) correspondiente al valor A, la muestra del alimento puede comprender opcionalmente al menos
30 un aditivo antioxidante exógeno (adicionado), con funciones de conservante; dicho aditivo antioxidante se representa en la ecuación (2) como $[Antiox-A]$. En una realización preferida de la invención, se puede incorporar a la muestra del alimento antes de la etapa b), si se desea, al menos un
35 aditivo exógeno con propiedades antioxidantes, es decir, con

capacidad estabilizadora del alimento. La cantidad adicionada debe ser conocida en todo momento con el objetivo de calcular su pseudo-constante cinética k . La adición del antioxidante sobre la muestra puede realizarse en polvo o en disolución.

5 En todos los casos antes descritos en los que la muestra comprende al menos un antioxidante añadido, puede utilizarse como dicho aditivo exógeno todo tipo de compuestos puros con propiedades antioxidantes, de origen natural o sintético, o extractos naturales que tengan propiedades antioxidantes, y
10 cualquier combinación de los mismos, siendo preferiblemente un antioxidante de la familia de los flavonoides. Más preferentemente aún, el flavonoide es catequina.

Adicionalmente, la presente invención comprende también un método para calcular la vida útil comercial de una unidad
15 o lote del alimento del cual se ha determinado su susceptibilidad a la oxidación lipídica por el procedimiento anteriormente descrito, definiéndose "vida útil comercial" como el periodo de tiempo máximo en el cual dicho alimento conserva una calidad organoléptica apta para ser adquirido
20 por el consumidor. De este modo, se entiende que si la muestra utilizada es representativa de la composición de un lote de dicho alimento en el mercado, se puede conocer entonces de manera aproximada cuál es la vida útil comercial genérica para dicho lote de alimento. De este modo, el método
25 para calcular la vida útil comercial de una unidad o lote de un alimento que contiene ácidos grasos insaturados almacenado a una temperatura constante comprende las etapas de:

- determinar la susceptibilidad a la oxidación lipídica de una muestra o lote de alimento de acuerdo con el
30 procedimiento descrito anteriormente, en cualquiera de sus variantes;
- determinar el límite máximo (umbral) de hidroperóxidos que puede contener dicho alimento para ser adquirido o comercializado, correlacionando la medida sensorial de
35 la rancidez olfativa con la medida periódica de la

concentración de hidroperóxidos realizadas al determinar la susceptibilidad a la oxidación lipídica;

- determinar la concentración inicial de hidroperóxidos de la muestra del alimento $[LOOH]_0$; y

- 5 - calcular el tiempo de vida útil comercial de la nueva muestra del alimento despejando t en la ecuación (1) desarrollada para determinar la susceptibilidad del alimento a la oxidación lipídica, donde:

- 10 • el valor de la concentración de hidroperóxidos predicho $[LOOH]$ se sustituye por el valor del límite máximo de hidroperóxidos que puede contener el alimento para ser comercializado;

- 15 • el valor $[LOOH]_0$ se sustituye por el obtenido en la etapa anterior para la nueva muestra del alimento; y

- 20 • el valor de A , que refleja la susceptibilidad de la nueva muestra o lote de alimento a oxidarse, se sustituye por el obtenido en el procedimiento para determinar la susceptibilidad del alimento a oxidarse.

La muestra o lote del alimento del que se calcula la vida útil comercial corresponde a la nueva muestra del alimento empleada en la etapa d) del procedimiento para determinar la susceptibilidad a la oxidación lipídica.

- 25 También de manera adicional, independientemente de si se ha calculado o no la vida útil comercial del alimento, la presente invención comprende un método para conocer la cantidad de aditivo antioxidante exógeno necesario para que una unidad o lote del alimento, del que se ha determinado la
- 30 susceptibilidad a la oxidación lipídica, tenga un tiempo de vida útil predeterminado, a partir del procedimiento descrito en la presente memoria en cualquiera de sus variantes. Así, el procedimiento para determinar la cantidad de aditivo antioxidante exógeno necesario para que una unidad o un lote
- 35 de un alimento que contiene ácidos grasos insaturados

almacenado a una temperatura constante tenga un tiempo de vida útil predeterminado comprende las siguientes etapas:

- determinar la susceptibilidad a la oxidación lipídica de una muestra o lote de alimento de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, en cualquiera de sus variantes;
- determinar el límite máximo (umbral) de hidroperóxidos que puede contener dicho alimento para ser consumido o comercializado, correlacionando la medida sensorial de la rancidez olfativa con la medida periódica de la concentración de hidroperóxidos realizadas al determinar la susceptibilidad a la oxidación lipídica;
- determinar la concentración inicial de hidroperóxidos de la muestra del alimento $[LOOH]_0$; y
- calcular la cantidad de antioxidante exógeno $[Antiox-A]$ a añadir a la nueva muestra del alimento para alcanzar un tiempo de vida útil comercial predeterminado mediante la ecuación (1), donde:
 - el valor de hidroperóxidos predicho $[LOOH]$ se sustituye por el valor del límite máximo de hidroperóxidos que puede contener el alimento para ser consumido/comercializado,
 - el tiempo t se sustituye por el tiempo de vida útil predeterminado;
 - el valor $[LOOH]_0$ se sustituye por el obtenido en la etapa anterior para la nueva muestra del alimento; y
 - el valor de A , que refleja la susceptibilidad de la nueva muestra o lote de alimento a oxidarse, se sustituye por el obtenido en el procedimiento para determinar la susceptibilidad del alimento a oxidarse.

Al igual que en el método anterior, la muestra o lote del alimento del que se calcula la cantidad mínima de antioxidante exógeno corresponde a la nueva muestra del

alimento empleada en la etapa d) del procedimiento para determinar la susceptibilidad a la oxidación lipídica.

Según lo anterior, se desprende claramente que una de las principales utilidades del procedimiento aquí descrito, que permite conocer la susceptibilidad o sensibilidad de un alimento a degradarse por oxidación lipídica, es que permite a su vez predecir y determinar el periodo de vida útil comercial de cualquier unidad o lote del alimento que se quiera comercializar, en base a la composición inicial de dicha unidad o lote. Esto aporta una ventaja añadida frente a la vida útil comercial calculada a partir de la muestra representativa del lote, porque permite ser más precisos a la hora de establecer los criterios que determinan el periodo de comercialización de un producto en el mercado. Lo mismo ocurre con la cantidad de antioxidante a añadir si se quiere ampliar la vida útil comercial de un producto alimenticio, que puede ser calculada de forma más precisa si se tiene en cuenta la composición inicial de la unidad o lote del alimento a comercializar. Este aspecto es fundamental, como ya se ha dicho, por cuanto es primordial optimizar la cantidad de antioxidantes que se añaden a los alimentos, debido a sus efectos secundarios/nocivos.

Básicamente, una vez conocidas las pseudo-constantes cinéticas K y partiendo de los valores experimentales de los parámetros medidos, correspondientes a la composición inicial de la nueva unidad o lote de la muestra del alimento problema, se calcula el valor de A y se sustituye en la ecuación (1) de predicción de la cantidad de hidroperóxidos lipídicos, para posteriormente calcular el tiempo al que equivale dicha concentración.

Del mismo modo, otro de los principales usos del procedimiento objeto de la presente invención para determinar la susceptibilidad de un alimento a la oxidación lipídica es que permite también calcular la cantidad mínima óptima de antioxidante que puede añadirse a una unidad o a un lote del

alimento para que alcance un tiempo de vida útil comercial predeterminado. Dicho cálculo puede (o no) realizarse de manera paralela al cálculo de la vida útil comercial (es decir, no es imprescindible calcular la vida útil para
5 conocer la cantidad de antioxidante).

En ambos métodos descritos, que corresponden a usos del procedimiento para determinar la susceptibilidad a la oxidación lipídica de un alimento, cuando se trata de un lote
10 no se realiza el procedimiento para cada unidad del alimento que compone dicho lote, sino en una muestra representativa del mismo. En este caso, las muestras para caracterizar la composición inicial del lote se toman de una unidad representativa de dicho lote, o de una mezcla de dos o más
15 unidades del lote, que se trituran y se mezclan hasta que obtener una mezcla homogénea.

De manera preferida, y al igual que en el caso del procedimiento para determinar la susceptibilidad del alimento a la oxidación, el cálculo de la vida útil comercial y de la
20 cantidad óptima de antioxidante a añadir para alargar dicha vida útil comercial puede realizarse mediante un programa informático.

Ambos usos del procedimiento para determinar la susceptibilidad a la oxidación lipídica de un alimento que
25 contiene ácidos grasos insaturados y que se almacena a temperatura constante permiten solventar las desventajas detectadas en el estado de la técnica, de la siguiente manera:

- El procedimiento tiene en cuenta la composición inicial
30 de una muestra del alimento, por lo que es válido para distintos lotes de un mismo producto alimenticio con una alta variabilidad composicional.
- Permiten predecir la variación de la concentración de hidroperóxidos lipídicos presentes en un tipo de
35 alimento, y por consiguiente de su vida útil comercial o

el modo en que se puede alterar dicha variación natural mediante antioxidantes exógenos.

Como consecuencia del desarrollo del método para
5 determinar la vida útil comercial de productos que contienen ácidos grasos insaturados, y/o para alargar dicha vida comercial mediante la adición de antioxidantes, se derivan los siguientes efectos:

- 10 - Se consigue calcular el periodo de vida útil comercial de un producto en condiciones para ser adquirido, en base a la composición, manipulación, tratamiento y almacenamiento.
- La precisión en la determinación del periodo aumenta a medida que aumenta el periodo de vida útil comercial.
- 15 - Se obtiene un aumento en la eficiencia del almacenamiento y la distribución del producto por parte de los productores/distribuidores al conocer el periodo de vida útil del producto.
- Se eliminan más eficientemente productos en mal estado de los mercados, así como mejora de la logística del producto por parte de los distribuidores.
- 20 - Se consigue un uso más eficaz y responsable de aditivos antioxidantes, puesto que la cantidad necesaria de antioxidante necesaria para obtener una inhibición eficaz de la oxidación es muy dependiente de la composición de la muestra y este tipo de aditivos pueden ser caros y/o potencialmente tóxicos a altas concentraciones.

Cada uno de los anteriores efectos lleva asociado un
30 beneficio económico debido a un ahorro en costes de logística, optimización de los recursos existentes y mejora de la imagen de la empresa. Asimismo, se optimiza la producción del alimento, ya que se minimiza la cantidad de aditivos con propiedades antioxidantes que se utilizan para
35 conservar el producto por un tiempo determinado.

Respecto a la primera etapa a), en el caso particularmente preferido en el que el alimento es pescado, los parámetros objeto de medición para una muestra de dicho
 5 pescado son: concentración de ácidos grasos insaturados como sustrato oxidable; ácido ascórbico y tocoferol como antioxidantes endógenos; y hemoglobina junto a hierro de bajo peso molecular como prooxidantes endógenos. Éstos pueden conocerse por métodos convencionales ampliamente conocidos,
 10 como por ejemplo los siguientes:

- Determinación de Ácido Ascórbico

La concentración de ácido ascórbico, medida en moles de ácido ascórbico/kg de muestra, se puede determinar en un sistema de cromatografía líquida con detector de
 15 fluorescencia (Iglesias J., Gonzalez, M.J.; Medina, I.; *Determination of Ascorbic Acid dehydroascorbic acid in lean and fatty fish species by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection* 2006).

- Determinación de Tocoferol

20 La concentración de tocoferol, medida en moles de tocoferol/kg de muestra, se puede determinar en un sistema de cromatografía líquida con detector de fluorescencia (Cabrini, L.; Landi, L.; Stefanelli, C.; Barzanti, V.; Anna Maria, S., *Extraction of lipids and lipophilic antioxidants from fish tissues: A comparison among different methods. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 1992, 101, (3), 383-386).

- Determinación de Hemoglobina

30 La concentración de hemoglobina, medida en moles de hemoglobina/kg de muestra, se puede determinar a través de un método espectrofotométrico, escaneando la región Soret del espectro visible (400-440nm) (Richards, M. P.; Hultin, H. O., *Effect of pH on lipid oxidation using trout hemolysate as a catalyst: A possible role for Deoxyhemoglobin. Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48, 3141-3147).

- Determinación de hierro de bajo peso molecular

La cantidad de hierro total se puede determinar mediante ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy) (AOAC, Lead, Cadmium, Zinc, Copper and Iron in Foods. Atomic Absorption Spectrophotometry after Microwave Digestion: Official method 999.10. In Official Methods of Analysis). La línea de emisión para el hierro es 238.204nm. El hierro de bajo peso molecular, medido en moles de Fe de bajo peso molecular/kg de muestra, se calcula como diferencia entre el hierro total y el hierro procedente de la hemoglobina.

- Determinación de ácidos grasos insaturados

La determinación de ácidos grasos insaturados, medida en moles de ácidos grasos insaturados/kg de muestra, se puede realizar a través de un sistema de cromatografía gaseosa acoplado a un detector de ionización de llama (Lepage, G.; Roy, C. C., Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. J. Lipid Res. 1986, 27, (1), 114-120) a partir del extracto lipídico de la muestra (Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification Can. J. Biochem. Phys. 1959, 37, 911- 917).

En lo que se refiere a la etapa c), en el caso preferido del pescado antes comentado la ecuación (2) correspondiente al valor A corresponde a:

$$A = K_3 \times [LH] \times \left(\frac{K_1 \times [Fe] + [Hb] \times K_2}{[AscH] \times K_5 + [TocH] \times K_4 + [Antiox - A] \times K_6} \right) - [Hb] \times K_2 - [Fe] \times K_1$$

donde

[LH] = concentración de ácidos grasos insaturados;

[Fe] = concentración de Fe de bajo molecular;

[Hb] = concentración de hemoglobina;

[AscH] = concentración de ácido ascórbico;

[TocH] = concentración de tocopherol;

[Antiox-A] = concentración de al menos un aditivo antioxidante añadido al alimento;

y

$K_1...K_6$ = pseudo-constantes cinéticas de reacción.

Preferentemente, en muestras de pescado refrigeradas la medida periódica de la concentración de hidroperóxidos de la etapa b) se realiza cada 12 horas, a contar desde la medida inicial de concentración de hidroperóxidos lipídicos que se realiza nada más obtener la muestra($[LOOH]_0$). En el caso de muestras de pescado refrigeradas, la medida de hidroperóxidos se realizará preferentemente hasta 12 horas después de detectarse el olor incipiente a rancio.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

A continuación se describen realizaciones concretas de la invención, a modo de ejemplo y con carácter no limitante de la misma. Dichos ejemplos muestran procedimientos para determinar la vida útil de un alimento que contiene ácidos grasos insaturados, concretamente una especie de pescado, sin antioxidantes exógenos y con adición de antioxidantes durante el procedimiento.

Ejemplo 1. Procedimiento de determinación de la susceptibilidad a la oxidación lipídica de un alimento de acuerdo con la presente invención, y su utilización para determinar la vida útil de 2 lotes diferentes de Jurel almacenado refrigerado, sin aditivos antioxidantes.

Se obtuvieron 10 lotes de jurel a lo largo de 2 años, con una variabilidad representativa de la que nos podemos encontrar en el mercado, capturados 24 horas antes de la preparación de las muestras. El músculo de pescado se separó de la piel y se trituro para proceder a su homogeneización. Se tomaron diferentes alícuotas del músculo homogeneizado para determinar los niveles iniciales de ácido ascórbico, tocoferol, hemoglobina, hierro de bajo peso molecular y ácidos grasos insaturados.

A continuación se midió la evolución de la oxidación lipídica (su concentración) en cada lote cada 12 horas a través de la determinación de la concentración de

hidroperóxidos y de un análisis sensorial. La temperatura de almacenamiento fue de 4°C, correspondiente al almacenamiento refrigerado de productos frescos.

Los valores de hidroperóxidos obtenidos en las cinéticas de oxidación de cada lote se introdujeron en el algoritmo creado mediante Matlab® y, se obtuvieron los valores de las distintas pseudo-constantes de reacción. El valor de cada pseudo-constante obtenida se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Pseudo-constantes de reacción de los distintos procesos involucrados en la reacción de la oxidación lipídica (k expresada como s⁻¹)

K_1	$5,21 \times 10^{-2}$
K_2	$3,28 \times 10^4$
K_3	1,06
K_4	$1,68 \times 10^3$
K_5	$6,10 \times 10^1$

El grado de oxidación lipídica también se determinó por medio de un análisis sensorial. Se correlacionaron los valores de hidroperóxidos correspondientes con la detección incipiente de olor a rancio, y se obtuvo que el valor umbral de hidroperóxidos que puede contener una muestra de jurel para no provocar rechazo por parte del consumidor es de 5×10^{-4} mol hidroperóxido/kg músculo.

Una vez obtenido el valor de las distintas pseudo-constantes cinéticas y del valor umbral de hidroperóxidos que puede contener una muestra, se procedió con las muestras problemas. Se obtuvieron 2 nuevos lotes de jurel, capturados cada uno 24 horas antes de la preparación de las muestras. El músculo de pescado se separó de la piel y se homogeneizó. Se tomaron diferentes alícuotas del músculo homogeneizado para determinar los niveles iniciales de ácido ascórbico, tocoferol, hemoglobina, hierro de bajo peso molecular y ácidos grasos insaturados. Los resultados del análisis

composicional inicial obtenido para cada lote problema se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición inicial de las muestras problema

Concentración Mol/kg músculo	Muestra problema 1	Muestra problema 2
[Fe]	$4,20 \times 10^{-5}$	$3,70 \times 10^{-5}$
[Hb]	$6,18 \times 10^{-6}$	$3,80 \times 10^{-6}$
[RH]	$9,44 \times 10^{-2}$	$9,69 \times 10^{-2}$
[AscH]	$5,76 \times 10^{-5}$	$1,36 \times 10^{-5}$
[TocOH]	$7,91 \times 10^{-6}$	$4,41 \times 10^{-6}$

5

Estos datos se sustituyeron en la ecuación (1), que predice la evolución de la oxidación lipídica, obteniendo la vida útil comercial de la muestra. Se determinó la concentración de hidroperóxidos lipídicos en las muestras problemas 1 y 2 a lo largo del tiempo para comparar los resultados obtenidos con los datos predichos. Los periodos de vida útil comercial predichos y obtenidos experimentalmente se muestran en la Tabla 3.

15

Tabla 3. Vida útil comercial predicha y observada experimentalmente

	Experimental	Predicho
Muestra problema 1	1,78 días	1,90 días
Muestra problema 2	0,85 días	1,025 días

20

25

Los resultados muestran que es posible predecir el periodo de vida útil comercial del pescado, durante el cual el pescado todavía mantiene unas propiedades organolépticas adecuadas. El procedimiento descrito predice el tiempo de vida útil comercial con un error inferior a 12 horas para muestras de pescado grasas y semigrasas. El ejemplo también pone de relieve que la composición provoca grandes diferencias en el periodo de vida útil entre distintas muestras con distinta composición.

Ejemplo 2.- Utilización del procedimiento de determinación de la susceptibilidad a la oxidación lipídica de un alimento para determinar la vida útil de 2 lotes diferentes de Jurel almacenado refrigerado, al que se ha añadido una
5 **concentración baja de catequina como aditivo antioxidante.**

Se obtuvieron 10 lotes de jurel a lo largo de 2 años, con una variabilidad representativa de la que nos podemos encontrar en el mercado, capturados 24 horas antes de la preparación de las muestras. El músculo de pescado se separó
10 de la piel, se homogeneizó hasta obtener una mezcla bien homogénea, se formaron diferentes muestras y se adicionó una cantidad variable de catequina a varias muestras mientras que a otras no se adicionó el antioxidante exógeno, permitiendo así comparar los resultados. Se tomaron
15 diferentes alícuotas del músculo homogeneizado para determinar los niveles iniciales de ácido ascórbico, tocoferol, hemoglobina, hierro de bajo peso molecular ácidos grasos insaturados.

Se determinó la cinética de oxidación de cada una de las
20 muestras de los distintos lotes. También se realizó el análisis sensorial de las distintas cinéticas de oxidación para poder calcular el valor umbral de peróxidos. Los datos de las cinéticas de las muestras en ausencia de antioxidante se introdujeron en el algoritmo para el cálculo de las
25 pseudo-constantes de reacción, a excepción de la correspondiente a la pseudo-constante de reacción de la catequina. Una vez calculadas, se añadieron al algoritmo los datos de las cinéticas de las muestras donde había presencia de antioxidante. Con estos nuevos datos se calculó la pseudo-
30 constante cinética de la catequina. El valor de las distintas pseudo-constantes cinéticas obtenidas se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Pseudo constantes de reacción de los distintos procesos involucrados en la reacción de la oxidación lipídica (k expresada como s^{-1})

K_1	$5,21 \times 10^{-2}$
K_2	$3,28 \times 10^4$
K_3	1,06
K_4	$1,68 \times 10^3$
K_5	$6,10 \times 10^1$
K_6	$2,99 \times 10^1$

5 El valor umbral de hidroperóxidos, al tratarse del mismo alimento, corresponde al calculado en el Ejemplo 1.

Una vez obtenido el valor de las distintas pseudoconstantes cinéticas y del valor umbral de hidroperóxidos que puede contener una muestra, se procedió
 10 con las muestras problema. Se obtuvo 2 lotes de jurel, capturados 24 horas antes de la preparación de las muestras, de los que obtuvieron 3 muestras distintas a los que se adicionaron como aditivo catequina. Se tomaron diferentes
 15 alícuotas de músculo de cada una para determinar el contenido inicial de ácido ascórbico, tocoferol, hemoglobina, hierro de bajo peso molecular y ácidos grasos insaturados. Los resultados del análisis composicional inicial obtenido para cada sistema problema se muestran en la Tabla 5.

20 **Tabla 5. Composición inicial de las muestras problema**

Concentración Mol/kg músculo	Muestra problema 3	Muestra problema 4	Muestra problema 5
[Fe]	$8,44 \times 10^{-6}$	$8,44 \times 10^{-6}$	$3,28 \times 10^{-5}$
[Hb]	$9,22 \times 10^{-6}$	$9,22 \times 10^{-6}$	$1,09 \times 10^{-5}$
[RH]	$9,40 \times 10^{-2}$	$9,40 \times 10^{-2}$	$2,60 \times 10^{-2}$
[AsCH]	$4,42 \times 10^{-5}$	$4,42 \times 10^{-5}$	$1,64 \times 10^{-5}$
[TocOH]	$1,31 \times 10^{-5}$	$1,31 \times 10^{-5}$	$2,16 \times 10^{-6}$
[Catequina]	$8,62 \times 10^{-5}$	$3,45 \times 10^{-4}$	$8,62 \times 10^{-5}$

Introduciendo los valores de la composición inicial en la ecuación 1, que permite predecir la concentración de hidroperóxidos con el tiempo, se pudo calcular el periodo de vida útil comercial de cada muestra de jurel. En la Tabla 6 se muestran los distintos tiempos de vida útil comercial predichos frente a los calculados experimentalmente con unas diferencias máximas de 12 horas aproximadamente.

Tabla 6: Vida útil comercial predicha y observada

	experimentalmente	
	Experimental	Predicho
Muestra 3	2,05 días	2,46 días
Muestra 4	2,88 días	3,44 días
Muestra 5	2,61 días	3,15 días

Los resultados muestran que es posible predecir el periodo de vida útil comercial de pescado almacenado a 4 grados centígrados, al que se ha añadido distintas cantidades de un aditivo antioxidante, con un error respecto al valor experimental determinado de 12 horas. En este ejemplo también se quiere mostrar que para una misma cantidad de aditivo antioxidante añadida, $8,62 \times 10^{-5}$ moles de catequina, el periodo de vida útil cambia sustancialmente ya que el proceso de oxidación está ampliamente influido por la composición. Por tanto el modelo obtenido, además de para predecir el periodo de vida útil de un alimento, también ayuda a optimizar la cantidad de antioxidante a utilizar en base a la composición de la muestra.

Ejemplo 3: Utilización del procedimiento de determinación de la susceptibilidad a la oxidación lipídica de un alimento para determinar la vida útil de 2 lotes diferentes de Jurel almacenado refrigerado con altas concentraciones de catequina como aditivo antioxidante.

Acorde con el Ejemplo 2, se calcularon las distintas pseudo-constantes cinéticas. Se obtuvo un nuevo lote de jurel, capturado 24 horas antes de la preparación de las

muestras, del que obtuvieron 4 muestras distintas a las que se adicionaron como aditivo catequina. Se tomaron diferentes alícuotas de músculo de cada muestra para determinar el contenido inicial de ácido ascórbico, tocoferol, hemoglobina, hierro de bajo peso molecular y ácidos grasos insaturados. Los resultados del análisis composicional inicial obtenido para cada sistema problema se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Composición inicial de las muestras problema

Concentraci ^{on} Mol/kg músculo	Muestra problema 6	Muestra problema 7	Muestra problema 8	Muestra problema 9
[Fe]	$3,28 \times 10^{-5}$	$3,28 \times 10^{-5}$	$3,28 \times 10^{-5}$	$3,28 \times 10^{-5}$
[Hb]	$1,09 \times 10^{-5}$	$1,09 \times 10^{-5}$	$1,09 \times 10^{-5}$	$1,09 \times 10^{-5}$
[RH]	$2,60 \times 10^{-2}$	$2,60 \times 10^{-2}$	$2,60 \times 10^{-2}$	$2,60 \times 10^{-2}$
[AscH]	$1,64 \times 10^{-5}$	$1,64 \times 10^{-5}$	$1,64 \times 10^{-5}$	$1,64 \times 10^{-5}$
[TocOH]	$2,16 \times 10^{-6}$	$2,16 \times 10^{-6}$	$2,16 \times 10^{-6}$	$2,16 \times 10^{-6}$
[Catequina]	$1,72 \times 10^{-4}$	$2,59 \times 10^{-4}$	$3,45 \times 10^{-4}$	$6,90 \times 10^{-4}$

10

Introduciendo los valores de la composición inicial en la ecuación 1 se puede predecir la concentración de hidroperóxidos con el tiempo, y de ahí, calcular el periodo de vida útil comercial de cada sistema. En la Tabla 8 se muestran los distintos tiempos de vida útil comercial predichos frente a los observados experimentalmente durante 7 días.

15

Tabla 8: Vida útil comercial predicha y observada experimentalmente

20

	Experimental	Predicho
Muestra 6	> 7 días	> 7 días
Muestra 7	> 7 días	> 7 días
Muestra 8	> 7 días	> 7 días
Muestra 9	> 7 días	> 7 días

Los resultados muestran que, para la muestra utilizada, la cantidad de catequina adicionada provocó que no se detectara olor incipiente a rancio durante todo el experimento (7 días). El mismo resultado fue predicho satisfactoriamente por el procedimiento aquí desarrollado. Con esto se quiere mostrar que es posible optimizar la cantidad de aditivo antioxidante a añadir para obtener un efecto deseado predeterminado, con el consiguiente ahorro en materias primas que ello conlleva.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar la susceptibilidad de un alimento que presenta un contenido igual o mayor al 0,25% en ácidos grasos insaturados, almacenado a una temperatura constante, a degradarse por el desarrollo de la oxidación lipídica, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

a) determinar la composición inicial de al menos 10 muestras de distintos lotes del alimento en relación con los siguientes parámetros relacionados con la oxidación lipídica: concentración de sustrato oxidable, concentración de antioxidantes endógenos, concentración de prooxidantes endógenos, y opcionalmente de al menos un aditivo con propiedades antioxidantes añadido a las muestras;

b) medir periódicamente la concentración de hidroperóxidos en cada muestra de alimento almacenado a temperatura constante, y realizar simultáneamente un análisis sensorial del nivel de rancidez olfativa de la misma para determinar el fin de la medida de hidroperóxidos lipídicos, que es cuando se detecta un incipiente olor a rancio;

c) calcular la pseudo-constante cinética K de cada parámetro, medido en la primera etapa, relacionada con el desarrollo de la oxidación lipídica, mediante un algoritmo que minimiza el cuadrado de la diferencia entre el valor de hidroperóxidos medido de forma periódica en la etapa anterior y un valor de hidroperóxidos predicho en un momento t mediante la siguiente ecuación (1), a partir de unos valores de k preasignados:

$$[LOOH] = [LOOH]_0 \times e^{k \times t} \quad (\text{ecuación 1})$$

donde

$[LOOH]$ = concentración de hidroperóxidos predicha a tiempo t ;

$[LOOH]_0$ = concentración inicial de hidroperóxidos medida a tiempo 0;

t = tiempo; y

A se obtiene de la ecuación (2):

$$A = K_{n+1} \times [Sustrato] \times \left(\frac{K_1 \times [Proox]_1 + \dots + [Proox]_n \times K_n}{[Antiox]_{n+2} \times K_{n+2} + \dots + [Antiox]_{n+2+m} \times K_{n+2+m} + [Antiox-A]_{n+3+m} \times K_{n+3+m}} \right) - [Proox]_1 \times K_n - \dots - [Proox]_n \times K_n$$

5 donde

K = pseudo-constante cinética de reacción por oxidación lipídica del alimento

$[Sust]$ = concentración de sustrato oxidable

10 $[Proox]$ = concentración de prooxidantes endógenos presentes en la muestra

$[Antiox]$ = concentración de antioxidantes endógenos presentes en la muestra

$[Antiox-A]$ = concentración de aditivo con propiedades antioxidantes añadido al alimento; y

15 d) analizar la composición inicial de una nueva muestra o lote del alimento, de acuerdo con los parámetros medidos anteriormente, y calcular el parámetro A de la ecuación (2), con las pseudo-constantes obtenidas en el paso anterior y con los datos de la composición inicial de la
20 nueva muestra o lote, que refleja la susceptibilidad a oxidarse del alimento.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el alimento está almacenado a una temperatura comprendida entre 25°C y -50°C, incluidos ambos límites.

25 **3.** Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el alimento es seleccionado dentro del grupo compuesto por: un producto pesquero o acuicola, un producto derivado de la pesca, leche, nata, queso, mayonesa, helado, sopa, salsa y un alimento infantil.

30 **4.** Procedimiento según la reivindicación anterior, caracterizado porque el producto pesquero es un pescado azul.

5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, caracterizado porque cuando el alimento es un producto pesquero, los parámetros medidos para determinar la composición inicial son: concentración de ácidos grasos insaturados como sustrato oxidable; ácido ascórbico y tocoferol como antioxidantes endógenos; y hemoglobina junto a hierro de bajo peso molecular como prooxidantes endógenos.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que la ecuación (2) correspondiente al valor A es:

$$A = K_3 \times [LH] \times \left(\frac{K_1 \times [Fe] + [Hb] \times K_2}{[AscH] \times K_5 + [TocH] \times K_4 + [Antiox - A] \times K_6} \right) - [Hb] \times K_2 - [Fe] \times K_1$$

10 donde

[LH] = concentración de ácidos grasos insaturados;

[Fe] = concentración de Fe de bajo molecular;

[Hb] = concentración de hemoglobina;

[AscH] = concentración de ácido ascórbico;

15 [TocH] = concentración de tocoferol;

[Antiox-A] = concentración de al menos un aditivo antioxidante añadido al alimento; y

$K_1...K_6$ = pseudo-constantes cinéticas de reacción.

7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el algoritmo para calcular las pseudo-constantes cinéticas K se ejecuta mediante un programa informático.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque al menos un aditivo con propiedades antioxidantes añadido a las muestras es seleccionado dentro del grupo compuesto por: un compuesto natural puro con propiedades antioxidantes, un compuesto sintético puro con propiedades antioxidantes, un extracto natural con propiedades antioxidantes, y cualquier mezcla de los mismos.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que el aditivo es de la familia de los flavonoides.

10. Procedimiento según la reivindicación anterior, caracterizado por que el alimento es un pescado azul almacenado ultracongelado a una temperatura comprendida entre -50°C y -21°C , incluidos ambos límites, al que se adiciona un antioxidante natural de la familia de los flavonoides.

11. **Método para determinar el periodo de vida útil comercial** de una unidad o un lote de un alimento que presenta un contenido igual o mayor al 0,25% en ácidos grasos insaturados almacenado a una temperatura constante, **y/o calcular la cantidad mínima de aditivo antioxidante** que debe añadirse a dicha unidad o lote del alimento para alcanzar un tiempo de vida útil comercial predeterminado, caracterizado por que comprende:

- determinar la susceptibilidad a la oxidación lipídica de una muestra o lote de alimento de acuerdo con el procedimiento descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;

- determinar el límite máximo de hidroperóxidos que puede contener dicho alimento para ser adquirido o comercializado, correlacionando la medida sensorial de la rancidez olfativa con la medida periódica de la concentración de hidroperóxidos realizadas al determinar la susceptibilidad a la oxidación lipídica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;

- determinar la concentración inicial de hidroperóxidos de la muestra del alimento $[\text{LOOH}]_0$; y

- calcular el tiempo de vida útil comercial de la nueva muestra del alimento despejando t en la ecuación (1) desarrollada para determinar la susceptibilidad del alimento a la oxidación lipídica, donde:

- el valor de la concentración de hidroperóxidos predicho $[\text{LOOH}]$ se sustituye por el valor del límite máximo de hidroperóxidos que puede contener el alimento para ser comercializado;

- el valor $[LOOH]_0$ se sustituye por el obtenido en la etapa anterior para la nueva muestra del alimento; y

5

- el valor de A , que refleja la susceptibilidad de la nueva muestra o lote de alimento a oxidarse, se sustituye por el obtenido en el procedimiento para determinar la susceptibilidad del alimento a oxidarse;

y/o

10

- calcular la cantidad de antioxidante exógeno $[Antiox-A]$ a añadir a la nueva muestra del alimento para alcanzar un tiempo de vida útil comercial predeterminado mediante la ecuación (1), donde:

15

- el valor de hidroperóxidos predicho $[LOOH]$ se sustituye por el valor del límite máximo de hidroperóxidos que puede contener el alimento para ser consumido,

- el tiempo t se sustituye por el tiempo de vida útil predeterminado;

20

- el valor $[LOOH]_0$ se sustituye por el obtenido en la etapa anterior para la nueva muestra del alimento; y

25

- el valor de A , que refleja la susceptibilidad de la nueva muestra o lote de alimento a oxidarse, se sustituye por el obtenido en el procedimiento para determinar la susceptibilidad del alimento a oxidarse.

12. Método según una la reivindicación 11, caracterizado por que el cálculo se realiza mediante un programa informático.



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPANOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACION:		OEPM, Presentación Electrónica
(5) DIRECCION ELECTRONICA HABILITADA (DEH):		
(6-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CODIGO POSTAL: PAIS RESIDENCIA: CODIGO PAIS: TELEFONO: FAX: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCION DEL DERECHO: INVENCION LABORAL: CONTRATO: SUCESSION:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC) España ES Q 2818002D SERRANO, 117 MADRID 28 Madrid 28006 España ES <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(7-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/PASAPORTE:	MAESTRE DEL CURA RODRIGO España ES
(7-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/PASAPORTE:	PAZOS PALMEIRO MANUEL España ES
(7-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/PASAPORTE:	MEDINA MENDEZ ISABEL España ES

(8) TÍTULO DE LA INVENCION:	PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD A DESARROLLAR OXIDACIÓN LIPÍDICA EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS QUE CONTIENEN ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS.	
(9) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(10) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(12) DEPÓSITO:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	
(13) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:	LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS	
(14) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR: FECHA:	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(15) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:	
(16) AGENTE/REPRESENTANTE:	APELLIDOS: JAVIER NOMBRE: UNGRIA LOPEZ CÓDIGO DE AGENTE: 0392/1 NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DNI/CIF/PASAPORTE: DOMICILIO: AVDA. RAMON Y CAJAL, 78 LOCALIDAD: MADRID PROVINCIA: 28 Madrid CÓDIGO POSTAL: 28043 PAÍS RESIDENCIA: España CÓDIGO PAÍS: ES TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: oepm@ungria.es NÚMERO DE PODER: 201101882	
(17) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:	DESCRIPCIÓN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 30 REIVINDICACIONES: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 12 DIBUJOS: <input type="checkbox"/> N.º de dibujos: RESUMEN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: <input type="checkbox"/> N.º de figura(s):	

<p>ARCHIVO DE PRECONVERSION: <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:</p> <p>LISTA DE SECUENCIAS PDF: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:</p> <p>ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: <input type="checkbox"/></p> <p>OTROS (Aparecerán detallados):</p>	
<p>(18) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:</p> <p>DOC COPIA DNI: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:</p> <p>DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:</p> <p>DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:</p> <p>DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:</p> <p>DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:</p> <p>DOC COPIA OTROS: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:</p>	
<p>(19) NOTAS:</p>	
<p>(20) FIRMA:</p> <p>FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE:</p> <p>LUGAR DE FIRMA:</p> <p>FECHA DE FIRMA:</p>	<p>NOMBRE UNGRIA LOPEZ JAVIER - NIF 05211582N MADRID 02 Septiembre 2011</p>

CAPÍTULO 5

**DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN INTESTINAL DE PUFAs
OXIDADOS Y NO OXIDADOS DE CADENA LARGA
PRESENTES EN EL PESCADO, ASÍ COMO EL EFECTO
DE POLIFENOLES DE ORIGEN NATURAL EN DICHOS
PROCESOS**

5. DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN INTESTINAL DE PUFAs OXIDADOS Y NO OXIDADOS DE CADENA LARGA PRESENTES EN EL PESCADO, ASÍ COMO EL EFECTO DE POLIFENOLES DE ORIGEN NATURAL EN DICHS PROCESOS

5.1 Introducción

Tras el consumo de pescado o productos derivados de la pesca se inician dos procesos fisiológicos con el objetivo de asimilar sus PUFAs, la digestión y la absorción. La digestión de las grasas comienza en la boca, donde se segrega la lipasa lingual. Esta enzima hidroliza en el estómago los enlaces ésteres de los ácidos grasos de cadena corta y media de los triglicéridos (en las posiciones sn-1 y sn-3). Una vez que el alimento sale del estómago llega al duodeno, donde aumenta el pH, se liberan los ácidos biliares que emulsionan las grasas y se segrega el jugo pancreático. El jugo pancreático está formado por la lipasa pancreática, que cataliza la transformación de todos los triglicéridos en ácidos grasos libres y 2-monoacilgliceridos (227), además de por la fosfolipasa A2, la colesterol esterasa y la colipasa, que hidrolizan otros lípidos de la dieta como fosfolípidos y ésteres de colesterol. En el intestino delgado se produce la emulsion de las grasas y la hidrólisis de éstas. Cada vez que una gota de grasa llega a la mitad de su tamaño inicial por la agitación sufrida en el intestino delgado, su superficie total llega a ser el doble de la inicial. Las lipasas son enzimas hidrosolubles que solo actúan en la superficie de las gotas de grasa. El aumento de la superficie de contacto de la grasa con las células del intestino delgado también provoca que aumente la absorción de los ácidos grasos. De ahí la gran importancia de las sales biliares en la digestión. Los ácidos grasos libres y el 2-monoacilglicerol son absorbidos en el intestino delgado (228). Hay dos mecanismos que describen este proceso de absorción de los ácidos grasos. La difusión pasiva a través de la bicapa lipídica es el principal mecanismo para los ácidos grasos de cadena corta. Los ácidos grasos de cadena larga se absorben mediante un mecanismo de difusión pasiva y absorción mediada por proteínas. Una vez absorbidos, los ácidos grasos son reincorporados en las células epiteliales a mono, di y triacilgliceroles, así como a fosfolípidos y ésteres de colesterol, y posteriormente secretados como quilomicrones al sistema linfático (229).

La ingesta de pescado con una concentración elevada de lípidos oxidados puede representar un riesgo para la salud. Se ha demostrado una mayor incidencia de

arterioesclerosis y tumores en animales alimentados con lípidos oxidados (167). Estudios realizados con ratones que fueron alimentados con lípidos oxidados mostraron que se alcanzaban mayores niveles de lipoproteínas oxidadas (166) y MDA (230) en suero. Asimismo, hay estudios que indican que el aumento del estrés oxidativo (hidroperóxidos lipídicos y MDA) está relacionado con un aumento de la resistencia a la insulina (231), del índice de masa corporal (232) y la hipertensión (233), sugiriendo que el consumo de grasas oxidadas puede acelerar el desarrollo del síndrome metabólico. Además, la presencia de hidroperóxidos lipídicos procedentes de los alimentos puede dañar los enterocitos intestinales (234) provocando su incorrecto funcionamiento. Se ha observado que la presencia de hidroperóxidos de ácido oleico es capaz de dañar la membrana y el ADN de células Caco-2 (235).

Los subproductos de degradación de la oxidación lipídica se pueden formar durante el almacenamiento y/o procesamiento del producto pesquero (45), y también en el interior del aparato digestivo una vez que el alimento ha sido ingerido. El estómago sirve como almacenamiento temporal para el alimento recién ingerido, iniciándose una digestión previa al paso hacia el intestino delgado. Estudios realizados bajo condiciones de pH, temperatura y concentración de oxígeno similares a las encontradas en el estómago, indican que éste puede actuar como un “birreactor” capaz de oxidar los PUFAs presentes en el alimento (236). El pH ácido del estómago puede incrementar la actividad prooxidante de las hemoproteínas (237), y la saliva secretada por la glándula parótida parece jugar un papel doble en la oxidación dentro del estómago, incrementando la oxidación lipídica por la actividad de la lactoperoxidasa, y reduciéndola por la actividad del tiocianato (238). Como se ha indicado en repetidas ocasiones, el uso de polifenoles naturales ha mostrado mejorar la estabilidad oxidativa *ex vivo* (178), pero también se han mostrado eficaces inhibiendo la oxidación de ácidos grasos bajo condiciones encontradas en el estómago (168, 239) e incluso disminuyendo el daño en las membranas de los enterocitos inducido por la presencia de hidroperóxidos de ácido oleico (240). Asimismo, varios trabajos han mostrado la influencia de las catequinas en los procesos de absorción y metabolismo de los lípidos en el intestino delgado (241-243). Por lo tanto, los compuestos antioxidantes pueden actuar previniendo la formación de subproductos derivados de la oxidación lipídica y por tanto, inhibiendo sus efectos dañinos.

El objetivo del presente capítulo consistió en el estudio de la posible interacción de los compuestos del extracto de uva que se ha planteado en esta tesis con los PUFAs presentes en el pescado durante su digestión y asimilación. Para ello se estudió:

- El desarrollo de la oxidación en el tracto gastrointestinal durante la digestión de los PUFAs.
- La bioaccesibilidad, absorción intestinal y metabolismo intestinal de los PUFAs oxidados y no oxidados.
- El efecto del consumo conjunto de antioxidantes polifenólicos y producto pesquero en el desarrollo de productos de oxidación en el sistema digestivo, en la absorción intestinal y metabolismo intestinal de PUFAs.

Para la ejecución de dichos objetivos se llevaron acabo estudios de la digestión de músculo de pescado utilizando como especie Mujol gris (*Mugil cephalus*). Se estudió la estabilidad oxidativa durante la digestión del músculo de pescado, así como la bioaccesibilidad de subproductos procedentes de la oxidación lipídica en el intestino delgado, utilizando el simulador del tracto gastrointestinal TIM-1. La evolución de la oxidación lipídica del pescado fue estudiada en presencia y ausencia del extracto de uva en el estómago y en los diferentes dializados obtenidos del intestino delgado. El DHA, ácido palmítico y el DHA oxidado a través de una lipoxidasa se utilizaron para estudiar la absorción y metabolismo en un modelo de células Caco-2 en presencia de antioxidantes polifenólicos.

5.2 Material y métodos

5.2.1 Reactivos

La α -amilasa, la pepsina, la bilis, la albúmina de suero bovino (libre de ácidos grasos), el medio modificado Dubelco Eagle (DMEM), la tripsina, la lipoxidasa de soja, el epigallocatequin-galato (EGCG), el cloruro sódico, el cloruro cálcico, el hidrogeno fosfato sódico, el dihidrogeno fosfato potásico y el Tritón X 100 fueron adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich. El jugo pancreático se extrajo de páncreas de cerdo y se obtuvo de Paines y Byrne (Green Ford, Reino Unido). La lipasa de Rhizopus se obtuvo de Amano Enzyme, Inc (Nagara, Japón). Los reactivos y los medios para los cultivos celulares fueron obtenidos de GIBCO (Invitrogen, EEUU). El ácido palmitito y el DHA se adquirieron de Un Check-Prep (Elyain, Mn, USA). El ácido palmítico y el DHA marcado con ^{14}C se adquirieron en NEN (Boston, MA, USA). El taurocolato sódico se obtuvo en Calbiochem (La Jolla, CA, USA). El cloroformo, el metanol, el ácido acético, el dietil eter y el hexano fueron comprados en Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA). Las placas de la capa fina fueron adquiridas en Whatman (Hillsboro, OR, USA)

5.2.2 Material y equipo de cultivo celular

Para realizar el trabajo con los cultivos celulares se utilizó una cabina de flujo laminar recirculante vertical de clase II. Este tipo de cabinas ofrece protección al operario y la esterilidad necesaria para la manipulación de los cultivos celulares. Cada día, y previo a la utilización de la campana, ésta fue esterilizada con luz ultravioleta, y posteriormente la superficie de trabajo se limpió con etanol al 70%. Asimismo, el flujo de aire de la cabina fue conectado y mantenido durante un tiempo anterior a la manipulación celular para permitir su estabilización y asegurar el trabajo en condiciones de esterilidad. Las células fueron visualizadas y examinadas en contraste de fases en un microscopio de luz invertida para observar el tapiz celular de las cajas de cultivo y para realizar el recuento de las células en suspensión antes de una nueva siembra. Las células fueron mantenidas en cultivo en una estufa de CO_2 que se mantuvo a una temperatura constante de 37°C , y bajo una atmósfera humidificada compuesta por un 95% de aire y un 5% de CO_2 .

5.2.3 Cultivo de la línea celular Caco-2

Las células fueron cultivadas en cajas de plástico de 25 o 75 cm² o bien en placas de 6 pocillos. Las cajas de 25 y 75 cm² fueron utilizadas para el mantenimiento de la línea celular, mientras que las placas de 6 pocillos fueron utilizadas para los experimentos de absorción y metabolismo de ácidos grasos. Se utilizó material plástico estéril de uso único. El medio de cultivo utilizado fue el Medio Esencial Mínimo de Eagle modificado por Dubelco (DMEM) que contiene 25 mM de glucosa. Este medio fue suplementado con 4 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 1% de aminoácidos no esenciales y 20% de suero fetal bovino. El medio de cultivo preparado se conservó en el frigorífico a 4°C. Previo a su uso, el medio fue calentado a 37°C para evitar un choque térmico con las células. El volumen de medio de cultivo adicionado a las células fue de 0.2 ml/cm² de superficie, correspondiendo por lo tanto a 5 y 15 ml para las cajas de 25 y 75 cm², respectivamente. En las placas de 6 pocillos se añadió un volumen de 3 ml por pocillo. El cultivo fue mantenido en una estufa bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

Para iniciar el cultivo de las células se partió de un vial congelado que contenía entre 1 y 3x10⁶ células en un volumen de 1.5 ml de medio de cultivo con un 30% de suero fetal bovino y un 10% de glicerol. Las células se descongelaron rápidamente introduciendo el vial en agua caliente a 37°C. Una vez que el vial estuvo descongelado, las células fueron diluidas en 5 ml de medio de cultivo y centrifugadas a 3000 rpm. Una vez eliminado el sobrenadante de las células, éstas fueron resuspendidas en 5 ml de medio de cultivo y depositadas en una caja de 25 cm². Para que las células tuvieran tiempo suficiente para adherirse a la superficie de plástico de la caja de cultivo, el medio se cambió 72 horas después de la siembra. Posteriormente se cambió cada 48 horas debido al alto consumo de glucosa por parte de las células. Tras una descongelación, las células fueron re-sembradas dos veces antes de ser utilizadas para la realización de experimentos. Los experimentos fueron realizados con células en el estadio de diferenciación comprendido entre los días 14-18 después de llegar a confluencia y entre las re-siembras 30 y 45.

5.2.4 Mantenimiento de la línea celular Caco-2

Para el mantenimiento de la línea celular Caco-2 se utilizaron cajas de 25 cm² que eran tratadas con tripsina una vez que habían llegado al 80-90 % de confluencia. Las

células se separaron de la caja de cultivo, y se individualizaron, utilizando una solución de tripsina-AEDT (0.25% tripsina- 1mM AEDT) en solución de PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 8mM Na_2HPO_4 , pH 7.4). La tripsina y el AEDT se utilizaron conjuntamente, ya que las proteínas de adherencia y unión necesitan calcio y magnesio. La tripsina actuó produciendo la digestión de las proteínas de adherencia y el AEDT se encargó de secuestrar los cationes divalentes libres inhibiendo la actividad de proteínas calcio/magnesio dependientes. La solución tripsina-AEDT se preparó a partir de soluciones comerciales estériles.

5.2.5 Método de tripsinización y siembra de las células

La tripsinización de las células se realizó cada 5-6 días. Una vez que las células fueran individualizadas se sembraron con una densidad de 1.2×10^4 células/cm² en las cajas y de 2×10^4 en las placas de 6 pocillos. Para una caja 25 cm², el protocolo seguido fue el siguiente:

- Se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células 2 veces con 5 ml de PBS (37°C).
- Se retiraron los 5 ml de PBS y se añadió 1 ml de la solución de tripsina/AEDT precalentada a 37°C. Se dejó actuar la tripsina durante 5 minutos a 37°C en la estufa de cultivo, con la caja células completamente cerrada.
- Se retiraron las células del soporte plástico. Con ayuda de una pipeta estéril y 5 ml de medio de cultivo estándar (para inactivar la tripsina) se realizó la homogeneización e individualización celular, para facilitar su recuento y posterior siembra.
- Las células en suspensión fueron recuperadas en un tubo falcon estéril y centrifugadas a 1000 g durante 5 min.
- El sobrenadante se eliminó mediante aspiración. Posteriormente las células se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo y se tomaron 10 µL para su recuento.
- La densidad celular se determinó en una cámara de Neubauer. Con la ayuda de un microscopio de luz invertida se contaron las células en una superficie de 1mm². Posteriormente se extrapoló el resultado para conocer el número de células que había en el tubo.
- Conocida la densidad celular en el tubo, se procedió al cálculo del volumen de la suspensión celular necesaria para la siembra de las nuevas cajas o las placas de

6 pocillos. Esa cantidad se diluyó con medio de cultivo hasta el volumen final añadido.

5.2.6 Preparación del medio de cultivo con ácidos grasos marcados con ^{14}C

La preparación del medio de cultivo se realizó siguiendo la metodología propuesta por Murota et al. (244). El ácido palmítico (16:0) o el ácido docosaheptaenoico (22:6) utilizado a una concentración final de $30\mu\text{M}$, y el antioxidante, empleados a una concentración final de 45.8 ppm, se secaron bajo una atmósfera de N_2 . El porcentaje de los ácidos grasos marcados con ^{14}C fue de un 5% del total, y con una actividad específica de 54 mCi/mmol. Los lípidos secos fueron disueltos en etanol (0.5% del volumen total de la disolución) y posteriormente dispersos en 10 mM de taurocolato sódico en PBS, que se incubaron durante 1 hora a 37°C y con una agitación de 90 rpm.

5.2.7 Ensayos de absorción de ácidos grasos

La absorción neta de ácidos grasos se analizó siguiendo el procedimiento descrito por Trotter et. al. (245). Brevemente, el medio de las células Caco-2 fue cambiado por DMEM sin suero 15 horas antes del experimento. Al inicio del experimento, las células fueron incubadas con 2 ml de la mezcla taurocolato-ácidos grasos. A las 2 y 6 horas, el medio fue eliminado y las células lavadas dos veces con una disolución a 0°C de BSA al 0.5%, y tres veces con PBS a 0°C . La radioactividad fue medida usando un contador de centelleo líquido Beckman LS-5000 TD. La absorción de ácidos grasos se determinó por la actividad específica del medio de incubación.

5.2.8 Determinación del contenido en proteínas

La cantidad de proteínas se determinó siguiendo la modificación del método de Lowry (246), basado en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por los aminoácidos tirosina, triptófano y en menor grado, cisteína e histidina, para formar un complejo de molibdeno de color azul. La medida se realizó a través de la medida de la absorbancia a 660 nm. La recta de calibrado se realizó con albúmina de suero bovino como patrón.

5.2.9 Extracción lipídica

La extracción lipídica se realizó de acuerdo al método de Bligh y Dyer (247). Para ello, una alícuota de la muestra se mezcló con una disolución de metanol-diclorometano en relación 2:1 y se homogeneizó. Posteriormente se centrifugó la mezcla durante 10

minutos a 3000 rpm. La fase orgánica se separó de la acuosa. Se añadió una pequeña cantidad de sulfato sódico anhidro para secar los restos de fase acuosa que pudiera quedar en la fase orgánica, posteriormente se filtró y se guardó a -20°C.

5.2.10 Metabolismo de los ácidos grasos en las células Caco-2.

Todos los lípidos de las células fueron extraídos a partir de células sonicadas. La incorporación del ácido palmítico y el DHA marcado con ^{14}C en los metabolitos lipídicos fue analizado usando cromatografía en capa fina (248), donde la fase móvil estaba compuesta por hexano-dietiléter-ácido acético (70:29:1). La radiactividad de cada clase lipídica fue medida usando un detector de luminiscencia fotoestimulada (Phosphorimager Storm 840).

5.2.11 Cuantificación lipídica

La cuantificación lipídica se realizó por el método de Herbes y Allen (249) a partir del extracto lipídico. Para ello se pesaron previamente cápsulas de papel de aluminio en una balanza analítica con 4 decimales. A continuación se añadió un volumen de extracto lipídico en cada cápsula y se colocaron sobre una placa calefactora hasta la completa evaporación del disolvente. Una vez finalizada la evaporación, se retiraron las cápsulas de la placa calefactora y se colocaron en un desecador con el fin de enfriarlas. Una vez a temperatura ambiente, se volvieron a pesar las cápsulas para calcular la variación de peso de las mismas.

5.2.12 Medida de los dienos conjugados.

Para la determinación de los hidroperóxidos conjugados se siguió la metodología propuesta por la AOCS (250). El procedimiento está basado en la determinación espectrofotométrica de la absorbancia a 234 nm, que corresponde con el máximo de absorción de los hidroperóxidos con dobles enlaces conjugados. Una alícuota de la disolución que contiene los ácidos grasos fue disuelta en metanol o en hexano, dependiendo del medio donde se encontraba el ácido graso fuera acuoso u orgánico. El contenido de hidroperóxidos con dobles enlaces se expresó en milimoles de hidroperóxido de ácido linoleico, a partir de los datos de su coeficiente de extinción molar.

5.2.13 Oxidación del DHA.

Una solución stock de DHA marcado y no marcado con ^{14}C (5% y 95% respectivamente) fue preparado en etanol absoluto y posteriormente diluido en PBS. La disolución de DHA (22:6; 50 μM) fue oxidada con una lipoxidasa de soja (120U/100 nmol de ácido graso, 3 h a 37°C). La formación de dienos conjugados fue monitorizada espectrofotométricamente a 234nm. Se alcanzó una conversión del 63.5 \pm 6.3% de los ácidos grasos en dienos conjugados, expresada como μM de hidroperóxidos de ácido linoleico. Posteriormente se realizó una extracción lipídica para separar la lipoxidasa de los lípidos.

5.2.14 Preparación del sistema de músculo picado de Mujol Gris (*Mugil cephalus*).

El pescado fresco fue comprado en un mercado local. Una vez deshuesado y eviscerado, el músculo blanco sin piel fue separado. El músculo blanco se trituró en una picadora. El extracto de uva se añadió en polvo a una concentración de 200 ppm. Las muestras control fueron preparadas de manera idéntica pero sin la adición de antioxidantes. Las muestras de pescado fresco fueron usadas inmediatamente después de su preparación, mientras que en las muestras almacenadas el pescado se mantuvo durante 3 días a 4°C en presencia o ausencia de 200 ppm del extracto de semilla de uva.

5.2.15 Modelo de tracto gastrointestinal TIM-1

Los experimentos simulando el sistema gastrointestinal fueron realizados por un equipo TIM-1 que consta de 4 compartimentos. Éstos representan el estómago, el duodeno, el yeyuno y el ileon, y están conectados por válvulas controladas por medio de un ordenador. Por cada experimento se utilizaron 267.5 g de solución pancreática al 7%, 500 g de bilis de cerdo, 151.5g de una disolución de enzimas gástricas (formada por 1.5g de tampón de acetato sódico 1M, 37.5 mg de lipasa, 30mg de pepsina y 150g de una disolución electrolítica para el estómago que contiene 6.2g/L de NaCl, 2.2g/L KCl y 0.3g/L de CaCl_2), 150 g de agua Mili-Q, 1500g de secreción yeyunal (formada por 1300g de agua Mili-Q, 150g de bilis y 50g de solución electrolítica del intestino delgado, que continene 5g/L de NaCl, 0.6g/L de KCl y 0.3g/L de CaCl_2). Todos los parámetros fueron controlados por ordenador para simular la digestión gastrointestinal, de la manera más exacta posible, de un humano adulto después del consumo de una comida semisólida. Las muestras fueron recogidas

del estómago cada 30 minutos durante las primeras 2 horas, y de los dializados intestinales, que representan los productos digeridos bioaccesibles, a intervalos de 1 hora durante las primeras 5 horas. Para los experimentos, 100 g de músculo de pescado picado fueron mezclados con saliva artificial (que contiene 9600 unidades de amilasa), 30ml de tampón citrato y 100ml de solución electrolítica del estómago. Se añadió agua MiliQ hasta llegar a un volumen final de 300 mL. Esta mezcla fue introducida en el compartimento que representa el estómago y se inició la digestión. Todas las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis.

5.2.16 Extracto de semilla de uva rico en procianidinas.

Un extracto de uva rico en catequinas oligoméricas (procianidinas) fue preparado y cedido por la Dra Maria José Nuñez, del departamento de ingeniería química de la Universidad de Santiago de Compostela, según está descrito en el apartado 2 de Fundamentos de la Metodología Empleada.

5.2.17 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por análisis de varianza de una vía (ANOVA). Los análisis estadísticos fueron realizados con el software Statistica 6.0 (Statof, Tulsa, OK). Los datos fueron mostrados como media \pm desviación estándar. Valores de p inferiores a 0.05 fueron considerados significativos.

5.3 Resultados

5.3.1 Digestión de los PUFAs y bioaccesibilidad de los subproductos de la oxidación lipídica en los dializados intestinales.

La digestión y bioaccesibilidad de los PUFAs, procedentes de las diferentes muestras de pescado en los dializados del intestino delgado, se estudió utilizando el simulador del tracto gastrointestinal TIM-1. Antes de iniciar la digestión, se tomaron alícuotas de cada muestra para la determinación de la grasa total y la concentración de dienos conjugados (DC). El porcentaje de grasa obtenida en el músculo de mujol gris fue de un 6.78 ± 0.32 %. Los resultados de la concentración inicial de DC, antes de iniciar la digestión en el TIM-1 mostraron diferencias significativas entre las muestras de pescado almacenadas a 4°C con y sin antioxidante (Tabla 8), mientras que las muestras de músculo de pescado fresco y el músculo de pescado almacenado durante 3 días con antioxidante mostraron valores similares de hidroperóxidos lipídicos.

Tabla 8: Niveles de dienos conjugados en músculo de pescado antes de ser digeridos por el equipo TIM-1

	Mujol gris fresco	Mujol gris almacenado durante 3 días ²	Mujol gris almacenado durante 3 días con 200 ppm del extracto de uva ²
DC¹	11.78 \pm 1.32	17.78 \pm 2.19*	12.23 \pm 0.95

DC son expresados como milimoles de hidroperóxidos de ácido linoleico /g de grasa.

El almacenamiento se llevó a cabo a 4°C .

* $p < 0.05$ ($n=3$) Diferencias significativas se encontraron entre los valores de DC de mujol gris fresco y almacenado con 200 ppm de extracto de uva.

Durante la digestión con el sistema TIM-1, la cinética de la oxidación lipídica en músculo de pescado fue seguida en el compartimento que representa el estómago, y en los dializados procedentes del yeyuno y del íleon, representado estos últimos los productos bioaccesibles de la digestión en el intestino delgado (251, 252). La Figura 8 muestra que los niveles de DC en el compartimento que representa el estómago, indicativos de los productos primarios de la oxidación lipídica, se incrementaron en el pescado fresco y en el pescado almacenado durante 3 días a 4°C (ambos sin antioxidante añadido), mientras que el incremento en la concentración de DC en las muestras con extracto de uva fue significativamente menor en todos los puntos de muestreo ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que el extracto de semilla de uva utilizado continuó

inhibiendo la oxidación lipídica en el compartimento que simula el estómago, incluso 3 días después del almacenamiento del producto en estado refrigerado.

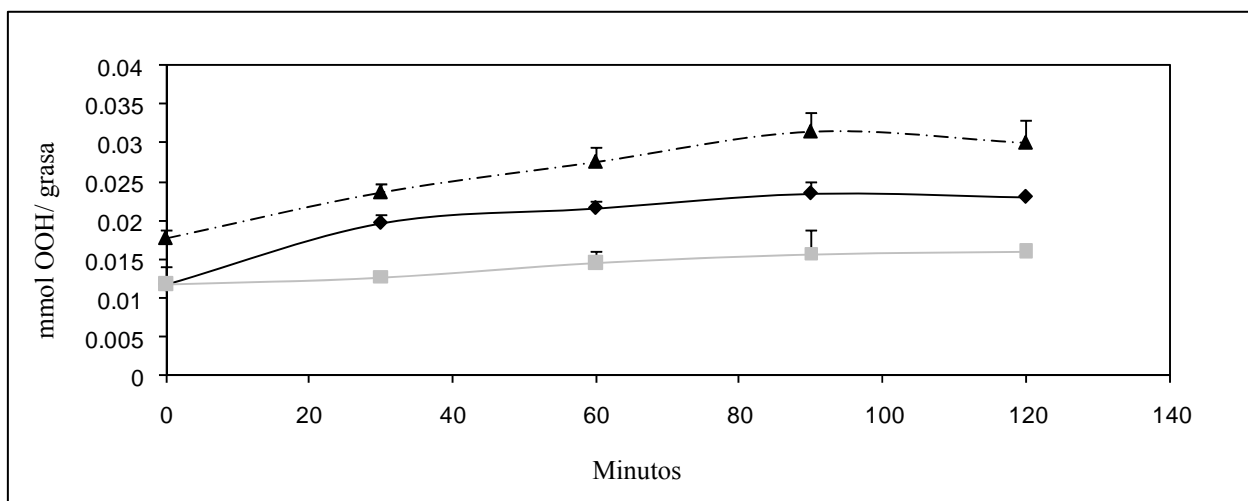


Figura 8: Concentración de dienos conjugados en el estómago del TIM-1

Los resultados se expresan como media±desviación estandar (n=3)

Pescado almacenado durante 3 días a 4°C en ausencia (- . - .) o presencia (—) de 200 ppm de extracto de uva y pescado sin almacenar (—)

En los dializados procedentes del yeyuno y del ileon (Figura 9), la concentración de DC procedente de las muestras de pescado almacenado sin extracto de uva añadido, fue significativamente mayor que los encontrados en los otros dos sistemas de pescado. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre pescado fresco y pescado almacenado con extracto de uva, a pesar de los mayores niveles de productos de oxidación encontrados en el estómago para la muestra de pescado fresco.

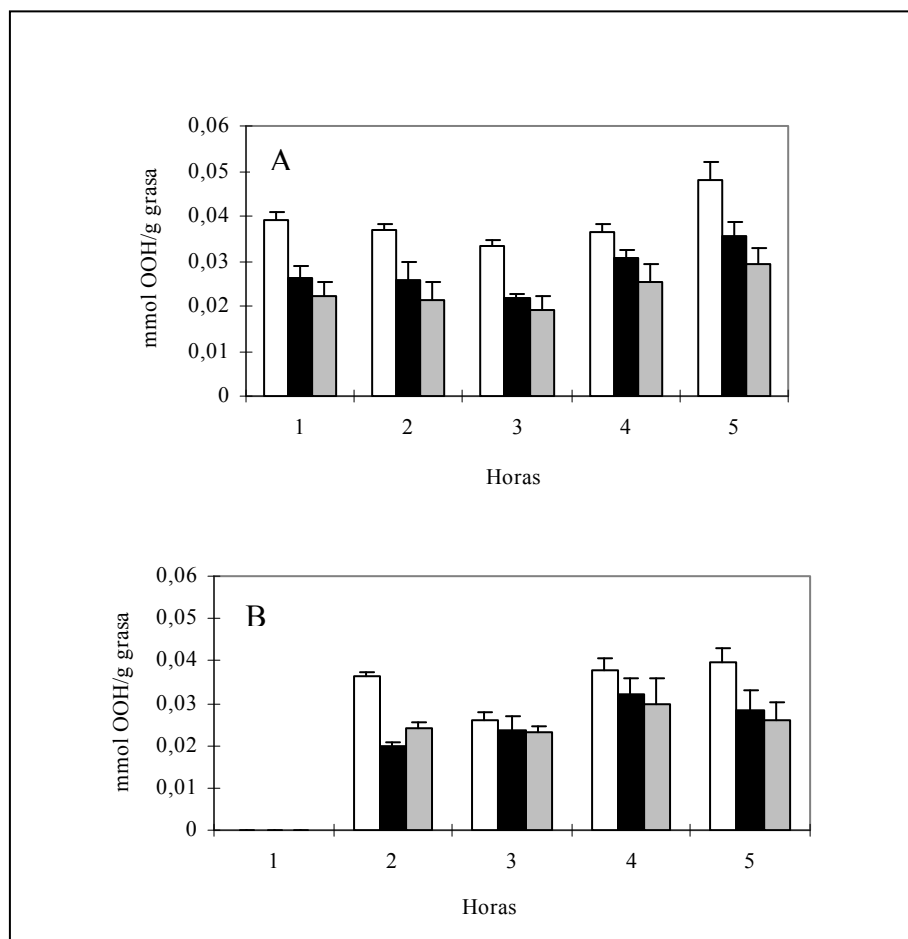


Figura 9: Valores de dienos conjugados obtenidos en los dializados de yeyuno (A) e íleon (B).

Las barras blancas corresponden con los dializados procedentes de mujol gris almacenado durante 3 días a 4°C, las barras negras corresponden a los dializados de pescado sin almacenar y las barras grises corresponden a los dializados de mujol gris almacenado en presencia de 200 ppm de extracto de uva.

5.3.2 Asimilación y metabolismo de los ácidos grasos por células Caco-2.

Se realizaron diferentes experimentos para examinar el efecto de la presencia de antioxidantes en la absorción de ácidos grasos. La asimilación de ácido palmítico o DHA añadido a la superficie apical de las células Caco-2 fue estudiada en presencia o ausencia de antioxidantes polifenólicos (EGCG y extracto de semilla de uva) usando micelas de taurocolato-ácido graso para reproducir la presentación fisiológica de los ácidos grasos en el lumen intestinal. La Figura 10A muestra que, después de 2 horas, el extracto de antioxidantes proveniente de semilla de uva y el EGCG no modificaron la absorción de DHA. Sin embargo, después de 6 horas de incubación con las células Caco-2 se encontró un aumento significativo en la absorción de DHA del 70 % en

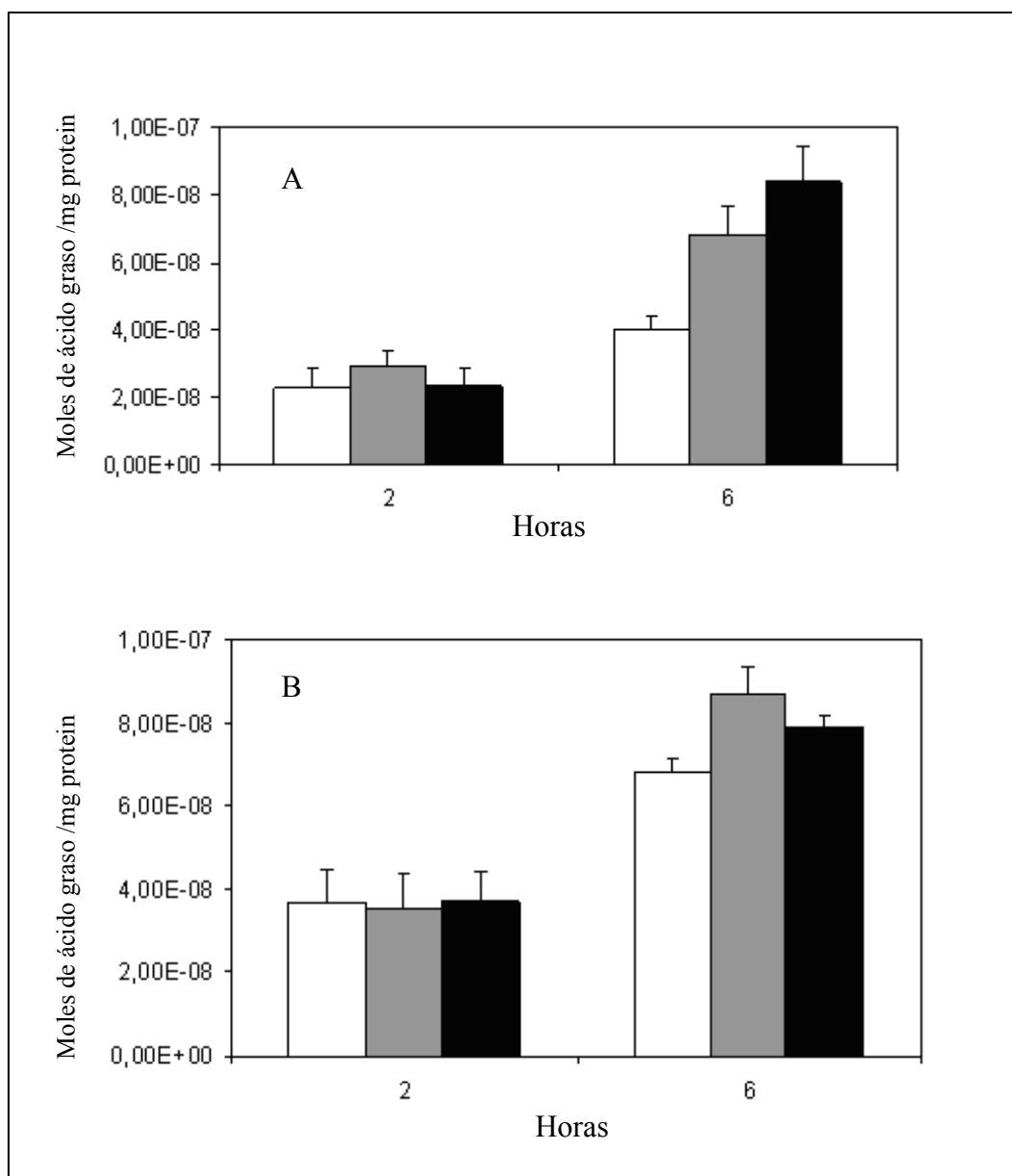


Figura 10: Absorción neta de ácidos (30 μ M) incubados con 45,8 ppm de antioxidantes.

Las barras blancas corresponden a células Caco-2 incubadas con DHA (A) o ácido Palmítico (B), las barras grises corresponden a las células incubadas con EGCG, y las barras negras corresponden con las células incubadas con el ácido graso y el extracto de uva.

aquellas que habían sido co-incubadas con EGCG y del 100% de absorción de DHA cuando se incubó en presencia del extracto de semilla de uva. Unos resultados similares se encontraron para la absorción de ácido palmítico, aunque los valores difirieron en menor magnitud. No se observaron diferencias significativas tras 2 horas de incubación en presencia de antioxidantes. Sin embargo, tras 6 horas la absorción de ácido palmítico por parte de las células Caco-2 fue aproximadamente un 25% mayor en presencia de EGCG y de un 15% en presencia del extracto de semilla de uva (Figura 10B) en comparación con la absorción ocurrida en ausencia de antioxidantes. Es decir, en presencia de antioxidante hay una absorción mayor, tanto de DHA como de ácido

palmítico, siendo el incremento de la absorción en relación a la situación sin antioxidante mucho mayor en el DHA. Se estudió el grado de oxidación que ocurría en el DHA durante el proceso de incubación de las células Caco-2. Los resultados indicaron que bajo las condiciones en las que se realizaron los experimentos de absorción de los ácidos grasos, y en ausencia de polifenoles, se observó un incremento significativo en los niveles de hidroperóxidos lipídicos (Figura 11).

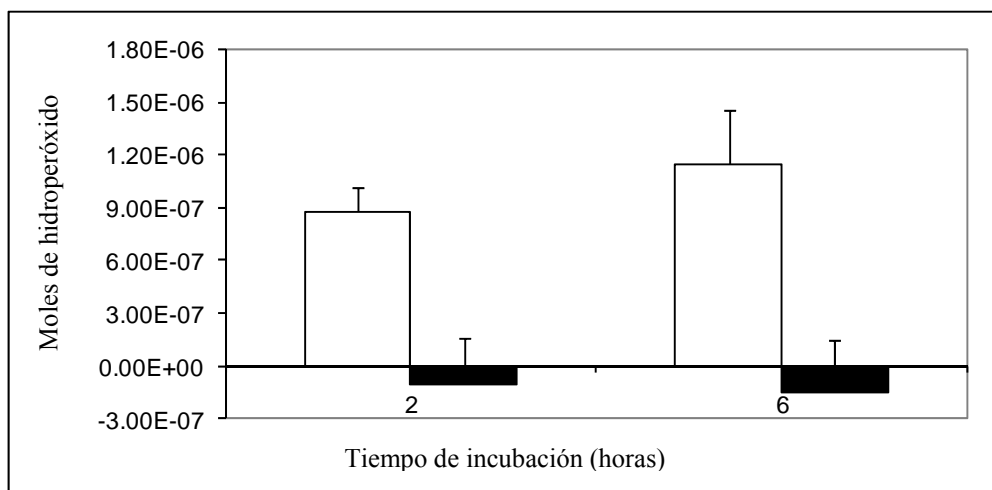


Figura 11: Incremento en el valor de DC del DHA (30µM) incubado con y sin extracto de uva (45.8ppm) bajo las mismas condiciones usadas con las células Caco-2.

Las barras blancas corresponden al incremento de hidroperóxidos lipídicos de una disolución de DHA, mientras que las barras negras corresponden con los valores de una disolución que contiene DHA y extracto de uva.

Por el contrario, no se observó un incremento en la concentración de productos de oxidación en el medio cuando el DHA fue incubado en presencia de extracto de semilla de uva. Esto significa que existe un porcentaje de DHA oxidado en las muestras incubadas con la línea celular cuando el antioxidante no está presente, y que la oxidación del DHA que ocurre durante la incubación de los ácidos grasos con las células Caco-2 puede ser inhibida con éxito por el extracto. Posteriormente se comparó directamente la absorción de DHA oxidado frente a DHA no oxidado por parte del modelo de células Caco-2. Para ello se utilizó el DHA oxidado por la lipoxidasa de soja. En la Figura 12 se puede observar que la cantidad de DHA oxidado absorbida por las células fue muy baja en comparación con la absorbida del DHA no oxidado.

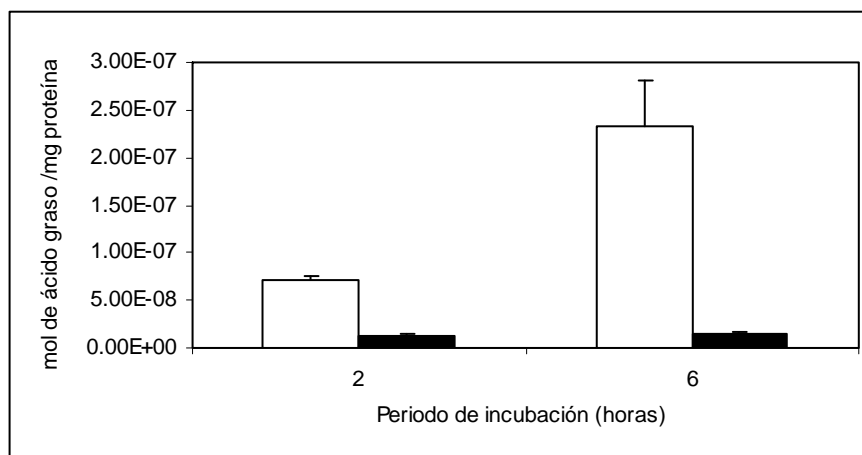


Figura 12: Absorción de DHA oxidado y DHA no oxidado por células Caco-2. Las células fueron incubadas con 30 μ M de ácido graso.

Las barras blancas corresponden a DHA no oxidado mientras que las barras negras corresponden a DHA oxidado

El metabolismo de los ácidos grasos absorbidos por parte de las células Caco-2 fue también analizado a través del DHA y el ácido palmítico marcado con ^{14}C . Para ello se estudiaron las distintas clases lipídicas donde estos ácidos grasos podían haberse incorporado. Se realizó una extracción lipídica de las células Caco-2 y posteriormente las distintas clases lipídicas se separaron en una placa fina. La radioactividad medida en cada clase lipídica sirvió para determinar la proporción de compuesto que procedía del ácido graso absorbido. Las Tablas 9 y 10 muestran las distintas clases lipídicas donde las células Caco-2 incorporaron los ácidos grasos marcados con ^{14}C en presencia o no del extracto de semilla de uva y el EGCG. No se encontraron diferencias significativas en la incorporación de los dos ácidos grasos a las distintas clases lipídicas en ausencia o presencia de antioxidantes.

Tabla 9: Incorporación del ácido palmítico marcado con ^{14}C en metabolitos lipídicos de células Caco-2 a diferentes tiempos.

Clase lipídica	2 horas de incubación			6 horas de incubación		
	AP	AP+EGCG	AP+Ext. de Uva	AP	AP+EGCG	AP+Ext. de Uva
TG	63.06±2.89	61.07±5.5	61.42±3.05	67.59±3.52	68.2±1.2	71.84±2.58
AGL	6.30±2.1	4.19±1.03	4.55±0.28	2.04±1.56	1.09±0.37	1.76±0.51
DG/C	5.07±1.29	6.29±0.41	5.05±1.13	4.22±0.05	4.52±0.51	4.26±0.78
MG	1.19±0.09	1.09±0.18	1.05±0.18	0.88±0.13	1.27±0.38	0.88±0.16
FL	24.26±5.19	27.35±4.05	27.93±2.6	24.88±4.8	24.9±1.36	21.23±2.47

AP=Ácido Palmítico; EGCG=Epigallocatequin galato; TG=Trigliceridos; AGL= Ácidos grasos libres; DG/C=Diacylglicerol / Colesterol; MG = Monoacylglicerol ; FL = Fosfolípidos.

Tabla 10: Incorporación del DHA marcado con ^{14}C en metabolitos lipídicos de células Caco-2 a diferentes tiempos.

Clase lipídica	2 horas de incubación			6 horas de incubación		
	DHA	DHA+EGCG	DHA+Ext. de Uva	DHA	DHA+EGCG	DHA+Ext. de Uva
TG	72.08±1.25	69.89±3.29	73.66±1.54	83.11±3.49	82.78±0.6	82.86±2.41
AGL	2.04±0.15	2.23±0.44	1.74±0.5	0.67±0.14	0.57±0.04	0.42±0.34
DG/C	2.09±0.03	2.08±0.02	1.84±0.31	1.47±0.39	1.62±0.29	1.40±0.08
MG	0.19±0.06	0.17±0.02	0.19±0.08	1.30±0.32	0.91±0.3	1.02±0.04
FL	23.58±1.51	25.62±2.80	22.55±0.41	13.54±0.32	14.42±1.21	14.58±2.15

DHA= Ácido Docosahexaenoico; EGCG=Epigallocatequin galato; TG=Trigliceridos; AGL= Ácidos grasos libres; DG/C=Diacylglicerol / Colesterol; MG = Monoacylglicerol ; FL = Fosfolípidos.

5.4 Discusión

En este capítulo de la memoria se observó que los ácidos grasos poliinsaturados presentes en el músculo de pescado son susceptibles a sufrir oxidación lipídica durante su digestión, y que el grado de oxidación del ácido graso afecta a su absorción intestinal. También se observó que la presencia de antioxidantes puede inhibir la oxidación que se produce en el tracto digestivo y favorece la absorción de los ácidos grasos por el sistema modelo de células Caco-2.

La primera parte de este capítulo muestra la bioaccesibilidad de los subproductos de la oxidación lipídica presentes en músculo de pescado almacenado bajo distintas condiciones iniciales, en el estómago y en los dializados intestinales. Las diferentes condiciones iniciales influyeron en el valor inicial de DC de cada muestra antes de simular su digestión. La presencia de 200 ppm de extracto de uva fue capaz de inhibir el desarrollo de la oxidación lipídica en músculo picado de mujol gril durante su almacenamiento refrigerado a 4°C. En capítulos anteriores de la presente tesis se ha observado ampliamente que el extracto de uva utilizado, rico en procianidinas, fue efectivo inhibiendo la oxidación en distintos sistemas lipídicos como liposomas (253), músculo picado de caballa (254) y músculo lavado de caballa (253). La oxidación de los PUFAs procedentes de pescado encontrada en el estómago ya había sido observada en otros trabajos que habían mimetizado sus condiciones *in vitro* (255, 256). Kanner et al sugirieron que el estómago puede actuar como un birreactor y acelerar la generación de hidroperóxidos lipídicos y la co-oxidación de los componentes de la dieta (168), debido principalmente a la temperatura fisiológica y a la presencia de grandes cantidades de catalizadores endógenos, como hemoproteínas o iones de hierro (50). Además, el pH cercano a 2 que presenta el estómago durante la digestión incrementa la actividad prooxidante de las hemoproteínas debido al efecto Bohr (237). La preexistencia de hidroperóxidos lipídicos también puede catalizar la oxidación de otros lípidos. La descomposición de los productos primarios de oxidación genera nuevos radicales libres que pueden catalizar la producción de nuevos hidroperóxidos lipídicos (29), hecho que se ha observado en alimentos parcialmente oxidados (168, 257). Por el contrario, la presencia de polifenoles naturales se ha mostrado eficaz inhibiendo la oxidación lipídica en el estómago (238, 256). El extracto de uva utilizado ha sido testado contra el desarrollo de la oxidación lipídica catalizada por prooxidantes endógenos en sistemas de músculo picado o en músculo lavado (253, 254), obteniendo en ambos casos excelentes

resultados, hecho que explicaría la ausencia de un incremento de los niveles de DC en el estómago (incluso bajo condiciones desfavorables de pH y Tª) de la muestra de pescado con 200 ppm de antioxidante añadido. Las diferencias en la concentración de dienos conjugados encontradas en el compartimento del estómago entre músculo de pescado fresco y pescado almacenado con extracto de uva no fueron encontradas en los dializados intestinales. Esta observación puede atribuirse a un agotamiento de la capacidad antioxidante del extracto de uva provocada por la alta cantidad de grasa (6.78 ± 0.32 %), así como por la protección ejercida durante el periodo de almacenamiento y en el estómago bajo condiciones altamente prooxidantes.

Las células Caco-2 son consideradas un modelo razonable que puede reproducir la asimilación lipídica en células epiteliales. La co-incubación de DHA con EGCG y con el extracto de semilla de uva provocó un importante aumento en la absorción del ácido graso poliinsaturado por parte de las células Caco-2, en comparación con la incubación del ácido graso sin presencia de antioxidantes. Si se compara directamente la absorción de DHA no oxidado frente a DHA oxidado, una importante disminución en la absorción del ácido graso oxidado fue observada. Por tanto, la mayor absorción de DHA por parte de las células incubadas con extracto de semilla de uva y con EGCG puede ser atribuido, al menos en parte, a su efecto directo inhibiendo la oxidación degradativa de los ω -3 PUFAs. La co-incubación de un ácido graso, el ácido palmítico, con polifenoles incrementó su absorción. Esto sugiere que el extracto de semilla de uva y el EGCG pueden ejercer un efecto indirecto en la absorción de ácidos grasos, además de su efecto antioxidante directo inhibiendo la oxidación lipídica de los PUFAs. El estatus redox de las células intestinales juega un papel clave en el control del crecimiento y función intestinal (258). Por tanto, la presencia de antioxidantes puede ayudar a mantener regulado el balance redox de las células Caco-2, promoviendo una mayor absorción de ácidos grasos, incluyendo los ácidos grasos saturados. De hecho, hidroperóxidos de ácido oleico han demostrado causar daño en las membranas de células Caco-2 (235), y los hidroperóxidos lipídicos han demostrado inducir apoptosis en células Caco-2. La presencia de hidroperóxidos lipídicos también ha demostrado descompensar vías de desintoxicación de los enterocitos, pudiendo provocar disfunción celular (259). Cuando la concentración de hidroperóxidos lipídicos es mayor que la capacidad de detoxificación de las células intestinales, se provocan lesiones celulares (260) e incrementos en la excreción de los ácidos grasos por las heces (261), hecho que explicaría la poca absorción de DHA oxidado detectado. Además, la degradación

oxidativa producida por un incremento en el estrés oxidativo puede provocar la pérdida de integridad de la membrana, una distorsión en los mecanismos de transporte de membrana, y cambios en su permeabilidad. Ho et al (262) sugirieron que la diferencia de absorción entre la membrana apical y basolateral de las células Caco-2 podría estar relacionada con diferencias en la fluidez de las membranas, ya que la membrana apical de las células Caco-2 tiene una fluidez menor que la membrana basolateral. Tanto el EGCG como el extracto de uva han mostrado disminuir la fluidez en membranas modelo (151, 254) como ha podido demostrarse en el capítulo 2 de la presente tesis. Se ha sugerido que el incremento del orden de los fosfolípidos de membrana provoca una disminución en la penetración de radicales libres en el interior de las cadenas hidrocarbonadas, inhibiendo también la propagación de radicales lipídicos en el interior de la estructura de la membrana. Adicionalmente, el estrés oxidativo ha mostrado causar alteraciones en la estructura de las proteínas como uniones, modificaciones de aminoácidos y fragmentación de proteínas, situación que podría disminuir la absorción mediada por proteínas. Por tanto, es posible que el correcto funcionamiento de las células Caco-2 se mantenga como consecuencia de la protección antioxidante ejercida por los polifenoles naturales, sobre la difusión pasiva a través de la bicapa lipídica así como sobre el transporte de ácidos grasos mediado por proteínas, explicando así la mayor absorción encontrada.

Se ha observado que los polifenoles pueden alterar el procesado y el empaquetamiento de los ácidos grasos en las lipoproteínas, disminuyendo los niveles de colesterol esterificado, debido a la inhibición de la diacilglicerol aciltransferasa, y a una disminución de la lipemia postprandial (241, 243, 263). Sin embargo, con la concentración de EGCG y de extracto de semilla de uva utilizada no se observaron diferencias en el metabolismo intracelular de los ácidos grasos en las células Caco-2.

5.5 Conclusiones

- Las condiciones de pH y temperatura del estómago, junto con la presencia de compuestos prooxidantes, provocaron la oxidación de los PUFAs presentes en el músculo de pescado. La presencia del extracto de uva rico en procianidinas permitió retardar el desarrollo de la oxidación de los PUFAs en el estómago.
- La presencia del EGCG y del extracto de uva incrementó la absorción de los ácidos grasos por parte de las células Caco-2. La absorción del DHA oxidado fue muy inferior respecto al DHA no oxidado. La presencia de polifenoles permitió proteger al DHA de la oxidación y disminuir el estrés oxidativo, que contribuyó a mantener el balance redox y la homeostasis de las células, y por tanto su correcto funcionamiento.
- La presencia de polifenoles no influyó en la resíntesis, por parte de las células Caco-2, de los ácidos grasos absorbidos en otras clases lipídicas.

V. DISCUSIÓN INTEGRADORA

Los resultados obtenidos en el primer capítulo permitieron identificar los mecanismos a través de los cuales la Hb media en el desarrollo de la oxidación lipídica en el músculo de pescado, así como el mecanismo ejercido por el extracto de uva rico en procianidinas para poder inhibirlo. En el primer trabajo se observó que la estabilidad de la Hb del pescado muestra un papel clave en su actividad prooxidante. La susceptibilidad de la Hb a transformarse en metaHb y la facilidad para liberar el grupo hemo siguió el mismo orden en las tres Hbs estudiadas (Abadejo>Jurel>Lubina), y coincidió con su capacidad prooxidante en liposomas y músculo de pescado lavado. Estos resultados sugieren que la actividad oxidativa de las Hbs está íntimamente ligada a los procesos intrínsecos de oxidación a metaHb y liberación del grupo hemo. La rápida autooxidación de la Hb de abadejo a metaHb puede explicarse en base a su reducida oxigenación inicial y la presencia de isoformas más aniónicas. La oxigenación de las isoformas aniónicas de Hb disminuye drásticamente en condiciones de pH ácido, típicamente encontradas durante el almacenamiento postmortem del músculo de pescado (pH: 6,5-5,0). Esta dependencia de la oxigenación de la Hb con el pH se conoce con el nombre de Efecto Bohr (76). La presencia de Hb en estado desoxigenado (deoxiHb) acelera la generación de metaHb (264). La deoxiHb presenta mayor velocidad de autooxidación que su forma oxigenada debido a su estructura menos compacta, que favorece la accesibilidad a su grupo hemo y la interacción con moléculas de disolvente y sustancias oxidantes del medio. Además, los datos obtenidos permitieron relacionar la formación de metaHb y la liberación de grupo hemo. De forma general, la forma oxidada metaHb presentó menor afinidad por el grupo hemo que la correspondiente forma reducida. La metaHb origina la formación de especies perferrilo ($\bullet\text{HbFe(IV)=O}$) mediante la reacción con peróxido de hidrógeno o hidróperóxidos lipídicos, productos primarios de la oxidación de los lípidos (265). La formación de especies perferrilo tiene una gran relevancia en la activación de la oxidación de lípidos debido a su capacidad para sustraer átomos de hidrógeno de la posición bis-alílica de los PUFAs (50). La liberación de grupos hemo puede contribuir a la oxidación de lípidos dada la mayor capacidad del hemo libre para descomponer hidroperóxidos que la Hb, especialmente en los primeros estadios de la oxidación cuando los niveles de hidroperóxidos y radicales libres son relativamente bajos (55). Otro aspecto relevante de los resultados obtenidos fue el papel activador de los productos de oxidación de los lípidos, hidroperóxidos y aldehídos, en la acción oxidante de la Hb. La interacción con hidroperóxidos y aldehídos lipídicos afecta negativamente a la estabilidad de la Hb, acelerando la formación de metaHb y la liberación del grupo

hemo. El incremento en la concentración de metaHb y de hemo libre en presencia de hidroperóxidos y aldehídos fue mayor para aquellas Hbs que mostraron una mayor inestabilidad (Abadejo>Jurel>Lubina), excepto en el caso de la liberación de grupo hemo por interacción con hidroperóxidos. El grupo hemo libre no está protegido por la estructura proteica de la Hb, y por tanto, los radicales libres generados de la reacción con los hidroperóxidos pueden descomponer con facilidad el grupo hemo a biliverdina y hierro libre. Diferentes evidencias sugieren que la destrucción del grupo hemo, con la consiguiente liberación de hierro, reduce la actividad oxidativa. Estudios con modelos animales han demostrado que la degradación del grupo hemo mediante la sobreexpresión de la enzima hemo oxigenasa reduce el estrés oxidativo, mientras que la inhibición de dicha enzima aumenta los niveles de oxidación (266). La presencia de hierro libre procedente de la descomposición del grupo prostético de la Hb no se detectó, indicando que este proceso no es significativamente influyente en el desarrollo de la oxidación catalizada por la Hb. Teniendo en cuenta que la capacidad para generar radicales libres de la metaHb y la oxiHb es similar (55), y la descomposición del grupo hemo producida en presencia de hidroperóxidos lipídicos, el mecanismo prooxidante de la Hb podría estar relacionado con la formación de especies perferriilo a partir de la metaHb. Por lo tanto, la realización de análisis previos como el nivel de oxigenación inicial y el análisis de las distintas isoformas que componen la proteína (factores claves que determinan la formación de metaHb) podría indicarnos el potencial oxidativo de la Hb de una especie.

Una vez determinados los mecanismos que rigen la oxidación lipídica mediada por la Hb, en el segundo trabajo se estudiaron las propiedades antioxidantes de los polifenoles que componen el extracto de uva que resultan más eficientes para inhibir la oxidación activada por la Hb. Con dicho proposito, se comparó la actividad antioxidante del extracto de uva con la de aditivos antioxidantes reductores (glutathione reducida, ácido ascórbico y catalasa) y quelatantes (AEDT, ácido cítrico, STTP y ATP), ya que los polifenoles del extracto de uva exhiben ambas propiedades antioxidantes, dador de electrones y quelante de metales. Los compuestos de naturaleza reductora mostraron mejores resultados que los aditivos con propiedades quelatantes, tanto en liposomas como en músculo lavado. Además, el análisis colorimétrico del “tono rojizo” en músculo lavado mostró que la formación de metaHb era menor en presencia de los compuestos reductores. Esta menor generación de metaHb en presencia de las

sustancias reductoras, y por tanto la menor formación de especies peróxido, puede explicarse razonablemente en base a la elevada actividad de los compuestos reductores para inhibir los productos de oxidación de los lípidos, que como ya hemos visto favorecen la formación de metaHb. Como se ha comentado anteriormente, la liberación de hierro procedente de la degradación del grupo hemo no tiene un papel muy significativo en la actividad prooxidante de la Hb, hecho que justificaría la menor eficacia antioxidante de los compuestos quelatantes. Aunque la Hb incubada en presencia del extracto de uva *in vitro* mostró una mayor formación de metaHb, probablemente debido a la capacidad de los polifenoles para producir H_2O_2 (117). El extracto de uva estudiado fue el aditivo que más retardó la formación de metaHb y mayor eficacia antioxidante mostró de todos los estudiados. La mayor interacción de los polifenoles con la Hb en los experimentos realizados *in vitro* que en sistema de músculo es probable que sea a que en el músculo los polifenoles también interactúan con compuestos mayoritarios como los PUFAs o las proteínas. Por lo tanto, esta investigación sugiere que la elevada eficiencia de los polifenoles del extracto de uva para inhibir la actividad oxidante de la Hb es debida fundamentalmente a su capacidad donadora de electrones. Esta capacidad reductora de los polifenoles de uva es muy eficiente retardando los productos de oxidación de los lípidos, que como se ha indicado anteriormente activan la acción pro-oxidante de la Hb mediante la formación de metHb y la liberación de grupo hemo.

Los experimentos contenidos en el segundo capítulo investigaron cómo influye la incorporación e interacción en las membranas celulares del extracto de uva y de los principales compuestos polifenólicos (procianidina B₂, catequina y epicatequina) presentes en él, en la actividad antioxidante de los polifenoles. El estudio de la incorporación de los aditivos antioxidantes a las membranas biológicas es relevante ya que los fosfolípidos se han sugerido como sustratos primarios de la oxidación (43, 44, 267). La distribución de los polifenoles en las membranas se investigó conjuntamente con las propiedades antioxidantes *in vitro*. Las propiedades antioxidantes *in vitro* indicaron mayor actividad para el extracto de uva y de la procianidina B₂ que para la catequina y la epicatequina, que a su vez fueron bastante similares. La procianidina B₂ presentó una capacidad antirradicalaria y quelatante similar al extracto de uva pero una capacidad reductora bastante mayor. La eficacia antioxidante encontrada en el sistema de músculo picado de caballa mostró que el extracto de semilla de uva era el

de uva era el antioxidante más eficaz, mientras que la epicatequina inhibió más eficazmente la aparición de hidroperóxidos lipídicos y de TBARS que la catequina, poniendo de manifiesto que las propiedades *in vitro* no tienen que coincidir con la efectividad antioxidante encontrada en los alimentos (217). Los estudios realizados en sistemas modelo de membranas mostraron que el extracto de uva producía un mayor incremento en la rigidez de los fosfolípidos de membrana en el interior de la bicapa lipídica que la procianidina B₂, propiedad que puede disminuir la propagación de los radicales lipídicos a lo largo de la membrana. También se observó un mayor efecto del extracto de uva frente a la procianidina B₂ en la formación de estructuras resistentes a la solubilización por detergentes, las cuales evitarían la penetración de prooxidantes acuosos (iones metálicos o hemoglobina) al interior de la membrana, donde se encuentran los dobles enlaces. Ambos hechos pueden ser debido a la presencia de polifenoles galoizados en el extracto de uva utilizado, los cuales han mostrado mayor incorporación e interacción con membranas que polifenoles no galoizados (151). Por tanto, aunque las propiedades antioxidantes *in vitro* de la procianidina B₂ son ligeramente superiores a las del extracto de uva, las interacciones de este último con las membranas biológicas provocarían que su actividad antioxidante sea mayor. En el caso de los monómeros, catequina y epicatequina, se encontró que el coeficiente de partición lípido-agua de la epicatequina fue mayor que el de la catequina. Esta mayor proporción de epicatequina en las membranas frente a la catequina incrementaría su actividad antioxidante, al ser las membranas el lugar donde se cree que se inicia la oxidación (43, 268). La reducida actividad antioxidante de los monómeros de flavanoles, en comparación con el extracto de uva y la procianidina B₂, es debido tanto a las menores propiedades antioxidantes *in vitro* como a su menor incorporación e interacción con las membranas.

Los resultados obtenidos en el tercer capítulo de la tesis mostraron la influencia que juega cada uno de los parámetros composicionales en el desarrollo de la oxidación lipídica en un sistema modelo de músculo picado de caballa. La relación que existe entre la composición inicial del músculo y la susceptibilidad del mismo a desarrollar la oxidación lipídica fue estudiada a través de dos herramientas estadísticas, la correlación lineal y la regresión múltiple. Ambos procedimientos estadísticos resaltaron la importancia de la concentración de sustrato oxidable a la hora de evaluar el inicio de la oxidación lipídica en músculo de caballa. Aunque otros autores habían observado que la

adición de triglicéridos a un sistema de músculo lavado de bacalao no aceleraba la oxidación lipídica en presencia de hemoglobina (41), este hecho puede ser debido a que la incorporación y la bioaccesibilidad de los triglicéridos añadidos al O₂ y a los compuestos prooxidantes no sea la misma que en los triglicéridos presentes de manera endógena. La correlación múltiple también mostró como parámetros significativos, además de la concentración de sustrato oxidable (expresado como concentración de PUFAs), la presencia de compuestos prooxidantes, como la cantidad total de hierro y Hb, así como el contenido de ácido ascórbico. La aplicación de un modelo de regresión múltiple para predecir el inicio de la oxidación en un sistema de músculo congelado de pescado mostró resultados similares, ya que se pudo ajustar el desarrollo en la cantidad de TBARs teniendo en cuenta la cantidad de lípidos autooxidables a 60°C (como sustrato oxidable) y al contenido de prooxidantes (hierro total y hemoproteínas) (269). La presencia de ácido ascórbico en el presente modelo puede ser debido a que es uno de los primeros antioxidantes hidrofílicos consumidos tras la muerte del pescado, debido a su elevado carácter reductor y a su capacidad para regenerar el tocoferol reaccionando con los radicales tocoferoxilo (69). La correlación múltiple proporcionó una ecuación basada en la concentración de diversos parámetros para determinar el inicio de la oxidación, aunque no fue capaz de explicar el desarrollo de la oxidación lipídica de todos los sistemas estudiados (datos no mostrados). Por tanto, para poder predecir el inicio de la reacción de oxidación lipídica se hace necesario el desarrollo de un modelo mecanístico que incluya una representación matemática explícita de los mecanismos implicados.

El capítulo 4 de la tesis abordó el desarrollo de un modelo mecanístico para la determinación de la susceptibilidad a sufrir oxidación lipídica de músculo de pescado, tomando como ejemplo músculo picado de caballa (*Scomber scombrus*), basándose en su composición inicial, condiciones de almacenamiento, así como la presencia de antioxidantes polifenólicos. Dicho modelo fue utilizado tanto para la determinación del periodo de vida útil del músculo de caballa, como para el cálculo de la cantidad de antioxidante necesaria para obtener un tiempo de vida útil comercial predeterminado en la muestra estudiada. Los resultados obtenidos a través del procedimiento patentado fueron bastante satisfactorios en los diferentes lotes de caballa estudiados. El ejemplo 1 mostró que el desarrollo de aromas asociados a la rancidez de 2 lotes de músculo de caballa, con un contenido en sustrato oxidable bastante similar, fue muy diferente (1.78 y 0.85 días). En el capítulo 3 de la tesis se dedujo que además de la cantidad de sustrato

oxidable, la presencia de prooxidantes y antioxidantes afecta de manera muy significativa al inicio del desarrollo de la oxidación lipídica. Basándose en la composición inicial, el procedimiento para la determinación de la susceptibilidad oxidativa predijo una vida útil comercial de 1.90 y 1.03 días, respectivamente, para los lotes estudiados. El procedimiento también proporcionó buenos resultados predictivos en presencia de un antioxidante añadido, y por tanto permitió predecir la eficacia del antioxidante en función de la composición. Los resultados mostrados en el ejemplo 2 pusieron de manifiesto que el procedimiento tiene en consideración la efectividad del antioxidante en función de la composición del músculo, ya que para una misma cantidad de catequina (8.62×10^{-5} mol/kg músculo) añadida sobre 2 lotes de pescado distintos (muestras 3 y 5), se estimaron unos tiempos de vida útil comercial de 2.46 y 3.15 días frente a los 2.05 y 2.61 días observados, respectivamente. Por último, el ejemplo 3 hace referencia a la posibilidad de poder optimizar la cantidad de aditivo antioxidante a añadir para obtener un efecto predeterminado. Diferentes cantidades de catequina añadida sobre un mismo lote de pescado (muestras 6, 7, 8 y 9) demostraron alargar la vida útil comercial de un lote de músculo de caballa más allá de los 7 días. Los resultados han mostrado las bases para el desarrollo de un procedimiento basado en la determinación de la vida útil de pescado y productos derivados de la pesca, así como la optimización en la adición de compuestos con actividad antioxidante. El procedimiento puede ser ensayado en diferentes especies de pescado, en otro tipo de alimentos, así como en diferentes condiciones de almacenamiento como el congelado y el ultracongelado, donde el mayor problema de estabilidad es la oxidación lipídica ya que la degradación microbiana es detenida.

En el capítulo 5 de la tesis se abordó el estudio funcional de los polifenoles en su consumo conjunto con los PUFA, utilizando diversos sistemas modelo que reproducen las condiciones tanto del sistema digestivo (TIM-1), como del epitelio intestinal (células Caco-2). La biaccesibilidad de los productos de degradación procedentes de la oxidación lipídica en un sistema de músculo picado de pescado fue observada tanto en el estómago como en los dializados procedentes de la absorción intestinal. Los polifenoles presentes en el extracto de uva fueron capaces de inhibir el desarrollo de la oxidación lipídica en el compartimento que representa el estómago. Sin embargo, dicha protección no se encontró en el intestino delgado ya que se midieron niveles similares de hidroperóxidos lipídicos en los dializados de las muestras de pescado con y sin polifenoles. Se sugirió que la protección antioxidante ejercida durante el

almacenamiento previo a la ingesta, y durante su periodo en el estómago bajo condiciones altamente prooxidantes (T^a , pH, presencia de Fe y Hb), así como la elevada cantidad de grasa presente en el músculo de pescado, podría haber consumido la actividad antioxidante del extracto de uva. La segunda parte del quinto capítulo de la tesis analizó la absorción del DHA y el ácido palmítico en un modelo de células epiteliales en presencia de antioxidantes polifenólicos. La co-incubación del DHA con antioxidantes polifenólicos provocó un aumento en la absorción del ácido graso insaturado. El consumo de DHA oxidado por parte de las células Caco-2 fue muy bajo comparado con el DHA no oxidado. El estudio de la absorción de ácido palmítico en presencia de polifenoles también mostró una mayor absorción del ácido graso saturado. Considerando que el ácido palmítico en ausencia de polifenoles no sufre una oxidación significativa debido a su naturaleza saturada, este resultado indica que hay otro efecto del antioxidante además de su protección contra la oxidación de los PUFA. El mantenimiento del estado redox de las células, que juega un papel clave en el crecimiento y función intestinal (255), así como la disminución del estrés oxidativo que pudiera dañar a las células y a proteínas involucradas en la absorción se postularon como los efectos complementarios a la protección de los PUFA que incrementaron la absorción de ácidos grasos. Por otro lado, se ha sugerido que la absorción intestinal podría estar relacionada con la fluidez de la membrana (262). En el capítulo 2 se observó un aumento en la rigidez de la membrana provocada por el extracto de uva, que también fue observada para el EGCG por otros autores (151). Este incremento en el orden de los fosfolípidos disminuiría la penetración de radicales libres, así como la propagación de radicales lipídicos en el interior de la membrana. Todos los indicios evidencian que la actividad antioxidante de los polifenoles es la responsable de la mayor absorción de los ácidos grasos, ya sea protegiendo a los PUFA, como a la célula o a las proteínas que median en la absorción de los ácidos grasos. Por último, aunque se había observado que la presencia de polifenoles podía alterar el metabolismo intracelular de los ácidos grasos (243, 244), sin embargo, la concentración de EGCG y de extracto de uva utilizada no produjo efecto alguno en la conversión del DHA y del ácido palmítico en las distintas clases lipídicas.

VI. CONCLUSIONES

A continuación, se destacan las conclusiones más relevantes que se desprenden de los resultados obtenidos de cada uno de los trabajos.

Involvement of Methemoglobin (MetHb) Formation and Hemin Loss in the Pro-oxidant Activity of Fish Hemoglobins.

Se encontró que la capacidad de las hemoglobinas de pescado para catalizar la oxidación lipídica está directamente relacionada con su inestabilidad intrínseca en términos de formación de metahemoglobina y liberación del grupo hemo. De las hemoglobinas analizadas, la de abadejo fue la que mayor actividad prooxidante mostró, seguida de la de Jurel y Lubina. La presencia de productos procedentes de la degradación lipídica fue propuesta como activadora de la oxidación lipídica catalizada por la hemoglobina, debido a su capacidad para acelerar la formación de metahemoglobina y la liberación del grupo hemo. El diseño de nuevos tratamientos enfocados a evitar la oxidación lipídica catalizada por la hemoglobina debe centrarse en el control de la formación de metahemoglobina y la liberación del grupo hemo.

Capacity of Reductants and Chelators to prevent Lipid Oxidation Catalyzed by Fish Hemoglobins

Los compuestos con capacidad para donar electrones mostraron una mayor eficacia inhibiendo la oxidación lipídica catalizada por la hemoglobina que los compuestos con capacidad para quelatar hierro. Esto sugiere que la neutralización de radicales libres, junto con la capacidad de reducir la perferrihemoglobina juega un papel más importante previniendo la actividad prooxidante de la hemoglobina que la capacidad de quelatar hierro liberado de las hemoproteínas. Las procianidinas presentes en el extracto de semillas de uva mostraron ser muy eficaces inhibiendo la oxidación lipídica catalizada por hemoglobina, siendo propuesto como un ingrediente efectivo para estabilizar los PUFAs de alimentos funcionales que contienen cantidades catalíticas de hemoglobina.

Incorporation and Interaction of Grape Seed Extract in Membranes and Relation with Efficacy in Muscle Foods

Se observó la existencia de una correlación entre la efectividad de compuestos antioxidantes de naturaleza polifenólica en músculo de pescado y su partición, su

localización en membranas, su efecto en la fluidez, en el orden de los fosfolípidos y su interacción con la superficie de las membranas. Aunque las propiedades antioxidantes de un compuesto son aquellas que van a determinar su eficacia, la interacción de éstas con la matriz a la que se le aplique ha mostrado influir de manera significativa. Esto significa que para alimentos basados en músculo, las interacciones físicas de los antioxidantes con las membranas celulares juegan un papel clave en la cinética de la oxidación lipídica.

La eficacia antioxidante encontrada en la inhibición de la oxidación lipídica en músculo de pescado para el extracto de semilla de uva y los principales compuestos en él, procianidina B₂, catequina y epicatequina, se relacionó con los siguientes aspectos:

- Una menor hidratación de la interfase líquido-agua observada por un aumento de los valores de polarización generalizada, que reduce el contacto de los lípidos de membrana con compuestos prooxidantes como el ión ferroso o la hemoglobina, y disminuye la penetración de radicales libres en el interior de los fosfolípidos de membrana. Además, la formación de estructuras altamente ordenadas, debido a la incorporación de antioxidantes también puede disminuir la accesibilidad de los radicales libres, capaces de iniciar o propagar la oxidación lipídica, hacia las cadenas hidrocarbonadas de los PUFAs.
- La localización de la procianidina B₂ y de los compuestos del extracto de uva en el interior de la bicapa lipídica podría inhibir la propagación de radicales libres a través de la formación de estructuras rígidas. La localización de los compuestos polifenólicos cerca de los sitios activos de la oxidación tiene como consecuencia una inhibición más eficaz de la oxidación lipídica por parte de los antioxidantes.

Role of Raw Composition of Pelagic Fish Muscle on the Development of Lipid Oxidation

Los resultados enfatizaron el importante papel del contenido en lípidos poliinsaturados en la susceptibilidad del músculo de un pescado graso como la caballa (*Scomber scombrus*) para desarrollar la oxidación lipídica. Junto con los lípidos insaturados, el contenido en prooxidantes acuosos, como el hierro y la hemoglobina, y el contenido en ácido ascórbico fueron también componentes que mostraron una significativa contribución para explicar su estabilidad oxidativa. El ajuste de la cinética

de oxidación a un modelo lineal puede ser una herramienta útil utilizada para predecir la vida útil del pescado.

Procedimiento para Determinar la Susceptibilidad a Desarrollar Oxidación Lipídica en Productos Alimenticios que Contienen Ácidos Grasos Insaturados.

Se consiguió desarrollar de un procedimiento para determinar la susceptibilidad a sufrir oxidación lipídica de músculo de pescado que permitió:

- Calcular el periodo de vida útil comercial del pescado en condiciones para ser adquirido, en base a la composición, manipulación, tratamiento y almacenamiento.
- Un uso más eficaz y responsable de aditivos antioxidantes, pudiendo optimizar la cantidad a adicionar al músculo para obtener un tiempo de vida medio predicho.

Aunque la metodología se desarrolló en una matriz de músculo de pescado refrigerado de caballa, dado que se trata de un modelo mecanístico, el procedimiento puede ser extrapolable a otro tipo de alimento bajo distintas condiciones de almacenamiento, donde la oxidación lipídica pueda representar un efecto limitante en la vida útil comercial del producto.

Digestión y Absorción Intestinal de PUFAs Oxidados y no Oxidados de Cadena Larga Presentes en el Pescado así como el Efecto de polifenoles de Origen Natural en dichos Procesos.

Se encontró que la adición del extracto de semilla uva estudiado en la presente tesis durante el almacenamiento y digestión de músculo de pescado limitó la aparición de productos asociados al desarrollo de la oxidación lipídica *in vivo*. También se observó una absorción muy baja de DHA oxidado, comparada con el DHA no oxidado, que parece indicar que los ácidos grasos ω -3 oxidados no se absorben como los no oxidados. Se observó un incremento en la absorción de ácidos grasos en un sistema modelo de células Caco-2 en presencia de antioxidantes polifenólicos, probablemente debido al mantenimiento del estado redox y a la homeostasis del epitelio intestinal, al mantenimiento de la integridad de las membranas y previniendo la oxidación de los PUFAs por parte de los antioxidantes.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Zaldivar, P., Las frutas y hortalizas como alimentos funcionales. *Contactos* **2003**, 47, 12-19.
2. Piggot, G. M., New approaches to marketing fish. *New Protein Foods* **1976**, 1-37.
3. Lovegrove, J. A.; Clohessy, A.; Milon, H.; Williams, C. M., Modest doses of Betta-glucan do not reduce concentrations of potentially atherogenic lipoproteins. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2000**, 72, (1), 49-55.
4. Billman, G. E.; Hallaq, H.; Leaf, A., Prevention of ischemia-induced ventricular fibrillation by omega 3 fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91, (10), 4427-4430.
5. Otten, W.; Iaizzo, P. A.; Eichinger, H. M., Effects of a high n-3 fatty acid diet on membrane lipid composition of heart and skeletal muscle in normal swine and in swine with the genetic mutation for malignant hyperthermia. *J. Lipid Res.* **1997**, 38, (10), 2023-2034.
6. Baillie, R. A.; Takada, R.; Nakamura, M.; Clarke, S. D., Coordinate induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fish oil: a mechanism for decreased body fat deposition. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **60**, (5-6), 351-356.
7. Briefing, B., *n-3 Fatty Acids and Health*. British Nutrition Foundation: London, 1999.
8. Chow, C. K., *Fatty acids in foods and their health implication*. 2000; p 1045.
9. Peet, M.; Stokes, C., Omega-3 Fatty Acids in the Treatment of Psychiatric Disorders. *Drugs* **2005**, 65, (8), 1051-1059.
10. Peet, M.; Stokes, C., Omega-3 fatty acids in the treatment of psychiatric disorders. *Drugs* **2005**, 65, (8), 1051-9.
11. FAO, *Fao documento técnico de pesca 348. El pescado fresco: Su calidad y cambios en su calidad*. 1999.
12. Stansby, M. E.; Hall, A. S., Chemical composition of commercially important fish of the USA. *Fish Ind Res* **1967**, 3, 29-34.
13. Bandarar, N. M.; Batista, I.; Nunes, M. L.; Empis, J. M.; Christie, W. W., Seasonal changes in lipid composition of sardine (*Sardina pilchardus*). *Journal of Food Science* **1997**, 62, (1), 40-42.
14. Henderson, R. J.; Tocher, D. R., The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progress in Lipid Research* **1987**, 26, 281-347.
15. Leger, C.; Bergot, P.; Luquet, P., Specific distribution of fatty acids in the triglycerides of rainbow trout adipose tissue, influence of temperature. *Lipids* **1977**, 12, (7), 538-543.
16. Luzia, L. A.; Sampaio, G. R.; Castellucci, C. M. N.; Torres, E. A. F. S., The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. *Food Chemistry* **2003**, 83, (1), 93-97.
17. Shirai, N.; Suzuki, H.; Tokairin, S.; Ehara, H.; Wada, S., Dietary and seasonal effects on the dorsal meat lipid composition of Japanese (*Silurus asotus*) and Thai catfish (*Clarias macrocephalus* and hybrid *Clarias macrocephalus* and *Clarias galipinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **2002**, 132, (3), 609-619.
18. Shirai, N.; Suzuki, H.; Toukairin, S.; Wada, S., Spawning and season affect lipid content and fatty acid composition of ovary and liver in Japanese catfish (*Silurus asotus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **2001**, 129, (1), 185-195.

19. Brown, A. J.; Roberts, D. C. K.; Truswell, A. S., Fatty acid composition of Australian marine finfish: A review. *Food Australia* **1989**, 41, 655–666.
20. Lovell, R. T., Nutrition of aquaculture species. *Journal of animal science* **1991**, 69, (10), 4193-4200.
21. Cejas, J. R.; Almansa, E.; Villamandos, J. E.; Badía, P.; Bolaños, A.; Lorenzo, A., Lipid and fatty acid composition of ovaries from wild fish and ovaries and eggs from captive fish of white sea bream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture* **2003**, 216, (1-4), 299-313.
22. Ågren, J.; Muje, P.; Hänninen, O.; Herranen, J.; Penttilä, I., Seasonal variations of lipid fatty acids of boreal freshwater fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **1987**, 88, (3), 905-909.
23. Frankel, E. N., Recent advances in lipid oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1991**, 54, (4), 495-511.
24. Jacobsen, C.; Timm, M.; Meyer, A., Oxidation in fish oil enriched mayonnaise: Ascorbic acid and low pH increase oxidative deterioration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 49, (8), 3947-3956.
25. Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; H., Z., Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* **1990**, 11, 81–128.
26. Fang, J. L.; Vaca, C. E.; Valsta, L. M.; Mutanen, M., Determination of DNA adducts of malonaldehyde in humans: Effects of dietary fatty acid composition. *Carcinogenesis* **1996**, 17, (5), 1035-1040.
27. Parker, L.; Ong, A. S. H., *Biological oxidants and antioxidants: Molecular mechanism and health effects*. Champaign, Illinois, 1998.
28. Kolanowski, W.; Swiderski, F.; Lis, E.; S., B., Enrichment of spreadable fats with polyunsaturated fatty acids omega-3 using fish oil. *Int J Food Sci Nutr* **2001**, 52, (6), 469-472.
29. Frankel, E. N., *Lipid Oxidation*. Dundee, Scotland, 1998.
30. Espín, J. C.; García-Conesa, M. T.; Tomás-Barberán, F. A., Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry* **2007**, 68, (22-24), 2986-3008.
31. Alford, J. A.; Elliott, L. E., Lipolytic activity of microorganism at low and intermediate temperatures. I. Action of pseudomonas fluorescens on lard. *Journal of Food Science* **1960**, 25, (2), 296-303.
32. Alford, J. A.; Smith, J. L.; Lilly, H. D., Relationship of Microbial Activity to Changes in Lipids of Foods. *Journal of Applied Microbiology* **1971**, 34, (1), 133-146.
33. Erikson, M. C., Lipid Oxidation of muscle foods. In *In food lipids. Chemistry, nutrition and biotechnology*. Ed. Eds Marcel Dekker: New York, 2002; pp 365-411.
34. Ho, C. T.; Chen, Q., Lipids in food flavors: an overview. *American Chemical Society* **1994**, 2656-2664.
35. Halliwell; Chirico, S., Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr* **1993**, 57, 715-725.
36. Aubourg, S. P., Recent advances in assessment of marine lipid oxidation by using fluorescence. *Journal of the American Oil Chemists Society* **1999**, 4, 409-419.
37. Thanonkaew, A.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Decker, E. A., Yellow discoloration of the liposome system of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) as influenced by lipid oxidation. *Food Chemistry* **2007**, 102, (1), 219-224.
38. Han, T. J.; Liston, J., Lipid peroxidation and phospholipid hydrolysis in fish muscle microsomes and frozen fish. *Journal Food Science* **1987**, 52, 294-299.

39. McDonald, R. E.; Hultin, H. O., Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle. *Journal Food Science* **1987**, 52, 15-21.
40. Richards, M. P.; Hultin, H. O., Rancidity development in a fish model system as affected by phospholipids. *Journal of Food Lipids* **2001**, 8, 215-230.
41. Undeland, I.; Hultin, H. O.; Richards, M. P., Added triacylglycerols do not hasten hemoglobin-mediated lipid oxidation in washed minced cod muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50, 6847-6853.
42. Undeland, I.; Ekstrand, B.; Lingnert, H., Lipid oxidation in minced herring (*Clupea harengus*) during frozen storage. Effect of washing and precooking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, 46, (6), 2319-2328.
43. Igene, J. O.; Pearson, A. M., Role of phospholipids and triglycerides in warmed-over flavor development in meat model systems. *Journal Food Science* **1979**, 44, 1285-1290.
44. Wu, T. C.; Sheldon, B. W., Influence of phospholipids on the development of oxidized off flavors in cooked turkey rolls. *Journal Food Science* **1988**, 53, 55-61.
45. Hultin, H. O., Oxidation of lipids in seafoods. In *Seafoods. Chemistry, processing, technology and quality.*, First edition ed.; Shahidi, F.; Botta, J. R., Eds. Blackie Academic and Professional: Suffolk, Great Britain, 1994; pp 49-74.
46. Dunstan, G. A.; Baillie, H. J.; Barrett, S. M.; Volkman, J. K., Effect of diet on the lipid composition of wild and cultured abalone. *Aquaculture* **1996**, 140, (1-2), 115-127.
47. Kanner, J.; Kinsella, J. E., Initiation of lipid oxidation by a peroxidase/hydrogen peroxide/halide system. *Lipids* **1983**, 18, 204-210.
48. German, J. B.; Bruckner, G. G.; Kinsella, J. E., Lipoxygenase in trout gill tissue acting on arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Biochimica and Biophysica Acta* **1986**, 875, 12-20.
49. Hsieh, R. J.; Kinsella, J. E., Lipoxygenase-catalyzed oxidation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: relevance and activity in fish tissue. *Journal of Food Science* **1986**, 51, 940-945.
50. Kanner, J., Oxidative processes in meat and meat products quality implications. *Meat Science* **1994**, 36, 169-189.
51. Eskin, N. A. M.; Przybylski, y. R., *Antioxidants and Shelf Life of Foods. Food Shelf Life Stability: Chemical, Biochemical and Microbiological Changes.* . Florida., 2000.
52. O'Brien, P. J., Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide. I. Decomposition of a lipid peroxide by metal ions, heme compounds, and nucleophiles. *Canadian journal of biochemistry* **1969**, 47, (5), 485-492.
53. Decker, E. A.; Hultin, H. O., Factors influencing catalysis of lipid oxidation by the soluble fraction of mackerel muscle. *Journal Food Science* **1990**, 55, 947-950.
54. Dickerson, R. E., Hemoglobin : structure, function, evolution, and pathology. In Dickerson, R. E.; Geis, I., Eds. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.: California, 1983.
55. Pazos, M.; Andersen, M. L.; Skibsted, L. H., Heme-Mediated Production of Free Radicals via Preformed Lipid Hydroperoxide Fragmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, (23), 11478-11484.
56. Kolakowska, A.; Olley, J.; Dunstan, G. A., Fish lipids. In Chemical and functional properties of food lipids. In Z. E. Sikorski and A. Kolakowska, Ed. Eds. CRC Press. Boca Raton: Florida, 2000; pp 221-224.

57. Baron, C. P.; Andersen, H. J., Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50, 3887-3897.
58. Richards, M. P.; Modra, A. M.; Li, R., Role of deoxyhemoglobin in lipid oxidation of washed cod muscle mediated by trout, poultry and beef hemoglobins. *Meat Science* **2002**, 62, 157-163.
59. Ryter, S. W.; Tyrrell, R. M., The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity: Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine* **2000**, 28, (2), 289-309.
60. Kanner, J.; Doll, L., Ferritin in turkey muscle tissue: a source of catalytic iron ions for lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1991**, 39, (2), 247-249.
61. Buettner, G. R., The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1993**, 300, (2), 535-543.
62. Miller, M. F.; Davis, G. W.; Seideman, S. C.; Ramsey, C. B.; Rolan, T. L., Effects of Various Phosphates on the Palatability, Appearance and Storage Traits of Flaked and Formed Restructured Beef Steaks. *Journal of Food Science* **1986**, 51, (6), 1435-1438.
63. Tims, M. J.; Watts, B. M., Protection of cooked meats with phosphates. *Food Technol* **1958**, 12, 240.
64. Gorelik, S.; Kanner, J., Oxymyoglobin oxidation and membrane lipid peroxidation initiated by iron redox cycle: Preservation of oxidation by enzymic and nonenzymic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 49, 5945-5950.
65. Ackman, R. G.; Cormier, M. G., Alpha-tocopherol in some Atlantic fish and shellfish with particular reference to live-holding without food. *J. Fish Res. Board Can* **1967**, 357-373.
66. Aminullah Bhuiyan, A. K. M.; Ratnayake, W. M. N.; Ackman, R. G., Nutritional Composition of Raw and Smoked Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*): Oil- and Water-Soluble Vitamins. *Journal of Food Composition and Analysis* **1993**, 6, (2), 172-184.
67. GroIngunn, H.; Jon Erik, J.; Kristin, H.; Åyvind, L.; Bernt, S.; Petter, A.; Jens Chr, H., Cage feeding of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*): effect on muscle lipid content, fatty acid composition, oxidation status and vitamin E concentration. *Aquat. Living Resour.* **1997**, 10, (6), 365-370.
68. Decker, E. A.; Livisay, S. A.; Zoy, S., Mechanisms of endogenous skeletal muscle antioxidants: Chemical and Physical aspects. In *Antioxidants in muscle foods*, Decker, E. A.; Faustman, C.; Lopez-Bote, C. J., Eds. John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2000; pp 25-60.
69. Niki, E., Antioxidant compounds. In *Chemical, Biological and Medical Aspects* Davis, K. J., Ed. Elmsford, NY, 1991; pp 57-64.
70. Navas, P.; Villalba, J. M.; de Cabo, R., The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses. *Mitochondrion* **2007**, 7, (Supplement 1), S34-S40.
71. Cabrini, L.; Stefanelli, C.; Fiorentini, D.; Landi, L., Ubiquinol prevents α -tocopherol consumption during liposome peroxidation. *Biochemistry International* **1991**, 23, 743-750.
72. James, A. M.; Smith, R. A. J.; Murphy, M. P., Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2004**, 423, 47-56.

73. Roginsky, V. A.; Bruchelt, G.; Bartuli, O., Ubiquinone-0 (2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone) as effective catalyzer of ascorbate and epinephrine oxidation and damager of neuroblastoma cells. *Biochemical Pharmacology* **1998**, 55, (1), 85-91.
74. Arroyo, A.; Navarro, F.; Navas, P.; Villalba, J. M., Ubiquinol regeneration by plasma membrane ubiquinone reductase. *Protoplasma* **1998**, 205, (1), 107-113.
75. Toldrá, F., Muscle foods: Water, structure and functionality. *Food Science and Technology International* **2003**, 9, (3), 173-177.
76. Richards, M. P.; Hultin, H. O., Effect of pH on lipid oxidation using trout hemolysate as a catalyst: A possible role for Deoxyhemoglobin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48, 3141-3147.
77. Undeland, I.; Kristinsson, H. G.; Hultin, H. O., Hemoglobin-mediated oxidation of washed minced cod muscle phospholipids: effect of pH and hemoglobin source. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 52 (14) 4444-4451 **2004**, 52, (14), 4444-4451.
78. Apgar, M. E.; Hultin, H. O., Lipid peroxidation in fish muscle microsomes in the frozen state. *Cryobiology* **1982**, 19, (2), 154-162.
79. Pelroy, G., A. ; Seman, J. P., Effect of EDTA Treatment on Spoilage Characteristics of Petrale Sole and Ocean Perch Fillets. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **1969**, 26, (10), 2651-2657.
80. Randell, K.; Ahvenainen, R.; Hattula, T., Effect of the gas/product ratio and CO₂ concentration on the shelf-life of MA packed fish. *Packaging Technology and Science* **1995**, 8, (4), 205-218.
81. Richards, M. P.; Hultin, H. O., Contribution of blood and blood components to lipid oxidation in fish muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50, 555-564.
82. Nielsen, N. S.; Jacobsen, C., Methods for reducing lipid oxidation in fish-oil-enriched energy bars. *International Journal of Food Science & Technology* **2009**, 44, (8), 1536-1546.
83. Jónsdóttir, R.; Bragadóttir, M.; Arnarson, G., Oxidatively Derived Volatile Compounds in Microencapsulated Fish Oil Monitored by Solid-phase Microextraction (SPME). *Journal of Food Science* **2005**, 70, (7), c433-c440.
84. Shaw, L. A.; McClements, D. J.; Decker, E. A., Spray-Dried Multilayered Emulsions as a Delivery Method for omega-3 Fatty acids into Food Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, 55, (8), 3112-3119.
85. Velasco, J.; Holgado, F.; Dobarganes, C.; Márquez-Ruiz, G., Influence of relative humidity on oxidation of the free and encapsulated oil fractions in freeze-dried microencapsulated oils. *Food Research International* **2009**, 42, (10), 1492-1500.
86. Gómez-Estaca, J.; Montero, P.; Giménez, B.; Gómez-Guillén, M. C., Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry* **2007**, 105, (2), 511-520.
87. Hamre, K.; Christiansen, R.; Waagbø, R.; Maage, A.; Torstensen, B. E.; Lygren, B.; Lie, Ø.; Wathne, E.; Albrektsen, S., Antioxidant vitamins, minerals and lipid levels in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.): effects on growth performance and fillet quality. *Aquaculture Nutrition* **2004**, 10, (2), 113-123.
88. Gatta; Pirini; Testi; Vignola; Monetti, The influence of different levels of dietary vitamin E on sea bass *Dicentrarchus labrax* flesh quality. *Aquaculture Nutrition* **2000**, 6, (1), 47-52.
89. dos Santos Fogaça, F. H.; Sant'Ana, L. S., Tocopherol in the lipid stability of tilapia (*Oreochromis niloticus*) hamburgers. *Food Chemistry* **2007**, 105, (3), 1214-1218.

90. Sanchez-Alonso, I.; Jimenez-Escrig, A.; Saura-Calixto, F.; Borderias, A. J., Effect of grape antioxidant dietary fibre on the prevention of lipid oxidation in minced fish: Evaluation by different methodologies. *Food Chemistry* **2007**, 101, (1), 372-378.
91. Undeland, I. Lipid oxidation in fillets of herring (*Clupea harengus*) during processing and storage. Chalmers University of technology, Goteborg, 1998.
92. Pérez-Mateos, M.; Lanier, T. C.; Boyd, L. C., Effects of rosemary and green tea extracts on frozen surimi gels fortified with omega-3 fatty acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2006**, 86, (4), 558-567.
93. Nera, E. A.; Iverson, F.; Lok, E.; Armstrong, C. L.; Karpinski, K.; Clayson, D. B., A carcinogenesis reversibility study of the effects of butylated hydroxyanisole on the forestomach and urinary bladder in male fischer 344 rats. *Toxicology* **1988**, 53, (2-3), 251-268.
94. Madrid, A.; Madrid, J., *Los aditivos en alimentos: Segun la Unión Europea y legislación Española*. Mundi prensa libros: Madrid, 2000.
95. Ito, N.; Hirose, M.; Fukushima, S.; Tsuda, H.; Shirai, T.; Tatematsu, M., Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology* 24, (10-11), 1071-1082.
96. Yasmin, A., Inhibition of Oxidation of Aqueous Emulsions of Omega-3 Fatty Acids and Fish Oil by Phloretin and Phloridzin. *Molecules* **2010**, 15, (1), 251-257.
97. Yanishlieva, N. V.; Marinova, E. M., Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2001**, 103, (11), 752-767.
98. Let, M. B.; Jacobsen, C.; Meyer, A. S., Ascorbyl Palmitate, Tocopherol, and EDTA Affect Lipid Oxidation in Fish Oil Enriched Salad Dressing Differently. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, 55, (6), 2369-2375.
99. He, Y.; Shahidi, F., Antioxidant Activity of Green Tea and Its Catechins in a Fish Meat Model System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, 45, (11), 4262-4266.
100. Dziezak, J., Preservatives, antioxidants. The ultimate answer to oxidation. *Food Technol* **1986**, 9, 94-102.
101. Bandarra, N.; Campos, R.; Batista, I.; Nunes, M.; Empis, J., Antioxidant synergy of tocopherol and phospholipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1999**, 76, (8), 905-913.
102. Lauritzsen, K.; Olsen, R. L., Effects of antioxidants on copper induced lipid oxidation during salting of cod (*Gadus morhua* L.). *Journal of Food Lipids* **2004**, 11, (2), 105-122.
103. Yi, O.-S.; Han, D.; Shin, H.-K., Synergistic antioxidative effects of tocopherol and ascorbic acid in fish oil/lecithin/water system. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1991**, 68, (11), 881-883.
104. Harborne, J. B., Plant phenolics. In *Methods in plant Biochemistry I*, Hall, C. a., Ed. London, 1989.
105. Bravo, L.; Saura-Calixto, F., Characterization of Dietary Fiber and the In Vitro Indigestible Fraction of Grape Pomace. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, 49, (2), 135-141.
106. Dreosti, I. E., Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition* **2000**, 16, (7-8), 692-694.
107. Parr, A. J.; Bolwell, G. P., Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2000**, 80, (7), 985-1012.

108. Moller, P.; Loft, S., Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2002**, 76, (2), 303-310.
109. Sang, S.; Lapsley, K.; Rosen, R. T.; Ho, C.-T., New Prenylated Benzoic Acid and Other Constituents from Almond Hulls (*Prunus amygdalus* Batsch). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 50, (3), 607-609.
110. Medina, I.; Sacchi, R.; Biondi, L.; Aubourg, S. P.; Paolillo, L., Effect of packing media on the oxidation of canned tuna lipids. Antioxidant effectiveness of extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, 46, (3), 1150-1157.
111. Sacchi, R.; Paduano, A.; Fiore, F.; Della Medaglia, D.; Ambrosino, M. L.; Medina, I., Partition behavior of virgin olive oil phenolic compounds in oil-brine mixtures during thermal processing for fish canning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50, (10), 2830-2835.
112. Iglesias, J.; Pazos, M.; Andersen, M. L.; Skibsted, L. H.; Medina, I., Caffeic Acid as Antioxidant in Fish Muscle: Mechanism of Synergism with Endogenous Ascorbic Acid and Tocopherol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 57, (2), 675-681.
113. Pazos, M.; Alonso, A.; Sanchez, I.; Medina, I., Hydroxytyrosol Prevents Oxidative Deterioration in Foodstuffs Rich in Fish Lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, (9), 3334-3340.
114. Hertog, M. G. L.; Hollman, P. C. H.; van de Putte, B., Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1993**, 41, (8), 1242-1246.
115. Lambert, J. D.; Sang, S.; Yang, C. S., Possible Controversy over Dietary Polyphenols: Benefits vs Risks. *Chemical Research in Toxicology* **2007**, 20, (4), 583-585.
116. Enrique, C., Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors* **1997**, 6, (4), 391-397.
117. Jia, Y.; Alayash, A. I., Effects of (-)-epigallocatechin gallate on the redox reactions of human hemoglobin. *Free Radical Biology and Medicine* **2008**, 45, (5), 659-666.
118. Balentine, D. A.; Wiseman, S. A.; Bouwens, L. C., The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **1997**, 37, (8), 693-704.
119. Carando, S. p.; Teissedre, P.-L.; Pascual-Martinez, L.; Cabanis, J.-C., Levels of Flavan-3-ols in French Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47, (10), 4161-4166.
120. Adamson, G. E.; Lazarus, S. A.; Mitchell, A. E.; Prior, R. L.; Cao, G.; Jacobs, P. H.; Kremers, B. G.; Hammerstone, J. F.; Rucker, R. B.; Ritter, K. A.; Schmitz, H. H., HPLC Method for the Quantification of Procyanidins in Cocoa and Chocolate Samples and Correlation to Total Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47, (10), 4184-4188.
121. Schieber, A.; Keller, P.; Carle, R., Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2001**, 910, (2), 265-273.
122. Khanbabaee, K.; van Ree, T., Tannins: Classification and Definition. *Nat Prod Rep* **2001**, 18, (6), 641-649.
123. Pazos, M.; Iglesias, J.; Maestre, R.; Medina, I., Structure-Activity Relationships of Polyphenols To Prevent Lipid Oxidation in Pelagic Fish Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58, (20), 11067-11074.

124. Laufenberg, G.; Kunz, B.; Nystroem, M., Transformation of vegetable waste into value added products:: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology* **2003**, 87, (2), 167-198.
125. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rhimeis, C.; Jimenez, L., Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2004**, 79, (5), 727-747.
126. Živković, J.; Mujić, I.; Zeković, Z.; Vidović, S.; Mujić, A., Capacity of extracts of sweet chestnut concerning to remove lipid peroxidation. *Journal Central European Agriculture* **2008**, 9, (2), 353-362.
127. Oboh, G.; Rocha, J., Water extractable phytochemicals from *Capsicum pubescens* (tree pepper) inhibit lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents in brain: in vitro. *European Food Research and Technology* **2008**, 226, (4), 707-713.
128. Kanatt, S. R.; Chander, R.; Radhakrishna, P.; Sharma, A., Potato Peel Extracta Natural Antioxidant for Retarding Lipid Peroxidation in Radiation Processed Lamb Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, (5), 1499-1504.
129. Visioli, F.; Romani, A.; Mulinacci, N.; Zarini, S.; Conte, D.; Vincieri, F. F.; Galli, C., Antioxidant and Other Biological Activities of Olive Mill Waste Waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47, (8), 3397-3401.
130. Lu, Y.; Yeap Foo, L., Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry* **2000**, 68, (1), 81-85.
131. Bocco, A.; Cuvelier, M.-E.; Richard, H.; Berset, C., Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, 46, (6), 2123-2129.
132. Pinelo, M.; Rubilar, M.; Sineiro, J.; Núñez, M. J., Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry* **2004**, 85, (2), 267-273.
133. Chen, B. H.; Tang, Y. C., Processing and Stability of Carotenoid Powder from Carrot Pulp Waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, 46, (6), 2312-2318.
134. Azizah, A. H.; Nik Ruslawati, N. M.; Swee Tee, T., Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chemistry* **1999**, 64, (2), 199-202.
135. Sheabar, F.; Neeman, I., Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1988**, 65, (6), 990-993.
136. De Sotillo, D. R.; Hadley, M.; Holm, E. T., Potato Peel Waste: Stability and Antioxidant Activity of a Freeze-Dried Extract. *Journal of Food Science* **1994**, 59, (5), 1031-1033.
137. Marinova, E. M.; Yanishlieva, N. V. I.; Kostova, I. N., Antioxidative action of the ethanolic extract and some hydroxycoumarins of *Fraxinus ornus* bark. *Food Chemistry* **1994**, 51, (2), 125-132.
138. Luther, M.; Parry, J.; Moore, J.; Meng, J.; Zhang, Y.; Cheng, Z.; Yu, L., Inhibitory effect of Chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties. *Food Chemistry* **2007**, 104, (3), 1065-1073.
139. Makris, D.; Boskou, G.; Andrikopoulos, N.; Kefalas, P., Characterisation of certain major polyphenolic antioxidants in grape (*Vitis vinifera* cv. Roditis) stems by liquid chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology* **2008**, 226, (5), 1075-1079.

140. Torres, J. L.; Varela, B.; García, M. T.; Carilla, J.; Matito, C.; Centelles, J. J.; Cascante, C.; Sort, X.; Bobet, R., Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50, 7548-7555.
141. Pinelo, M.; Arnous, A.; Meyer, A. S., Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology* **2006**, 17, (11), 579-590.
142. Leighton, F.; Urquiaga, I., Polifenoles del vino y salud humana. . *Antioxidantes y calidad de vida* **2000**, 7, 5-13.
143. Frankel, E. N.; Waterhouse, A. L.; Teissedre, P. L., Principal phenolic phytochemicals in selected california wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human Low-Density Lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, 43, 890-894.
144. Iglesias, J.; Pazos, M.; Lois, S.; Medina, I., Contribution of Galloylation and Polymerization to the Antioxidant Activity of Polyphenols in Fish Lipid Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58, (12), 7423-7431.
145. Pazos, M.; Alonso, A.; Fernandez-Bolaños, J.; Torres, J. L.; Medina, I., Physicochemical Properties of Natural Phenolics from Grapes and Olive Oil Byproducts and Their Antioxidant Activity in Frozen Horse Mackerel Fillets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 54, (2), 366-373.
146. Pazos, M.; González, M. J.; Gallardo, J. M.; Torres, J. L.; Medina, I., Preservation of the endogenous antioxidant system of fish muscle by grape polyphenols during frozen storage. *European Food Research and Technology* **2005**, 220, 514-519.
147. Brannan, R. G.; Mah, E., Grape seed extract inhibits lipid oxidation in muscle from different species during refrigerated and frozen storage and oxidation catalyzed by peroxynitrite and iron/ascorbate in a pyrogallol red model system. *Meat Science* **2007**, 77, (4), 540-546.
148. Karvela, E.; Makris, D. P.; Kalogeropoulos, N.; Karathanos, V. T., The effect of pH on the efficiency of vinification by-product extracts to inhibit lipid peroxidation a lecithin liposome model matrix. . *Journal of Food Quality* **2011**, 34, (5), 299-305.
149. Saint-Cricq de Gaulejac, N.; Provost, C.; Vivas, N., Comparative Study of Polyphenol Scavenging Activities Assessed by Different Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47, (2), 425-431.
150. Vennat, B.; Bos, M.-A.; Pourrat, A.; Bastide, P., Procyanidins from tormentil: fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. *Biol Pharm Bull* **1994**, 17, 1613-1615.
151. Caturla, N.; Vera-Samper, E.; Villalaín, J.; Mateo, C. R.; Micol, V., The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Biology and Medicine* **2003**, 34, (6), 648-662.
152. Gandemer, G., Lipids and meat quality: lipolysis, oxidation, Maillard reaction and flavour. *Sciences des Aliments* **1999**, 19, 439-458.
153. Pazos, M.; Lois, S.; Torres, J. L.; Medina, I., Inhibition of hemoglobin and iron-promoted oxidation in fish microsomes by natural phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54, (12), 4417-4423.
154. Atkinson, J.; Harroun, T.; Wassall, S. R.; Stillwell, W.; Katsaras, J., The location and behavior of α -tocopherol in membranes. *Molecular Nutrition & Food Research* **2010**, 54, (5), 641-651.

155. Zhu, Q. Y.; Huang, Y.; Tsang, D.; Chen, Z.-Y., Regeneration of Tocopherol in Human Low-Density Lipoprotein by Green Tea Catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47, (5), 2020-2025.
156. Sies, H., Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry* **1993**, 215, (2), 213-219.
157. Diplock, A. T.; Charuleux, J.-L.; Crozier-Willi, G.; Kok, F. J.; Rice-Evans, C.; Roberfroid, M.; Stahl, W.; Viña-Ribes, J., Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition* **1998**, 80, 77-112.
158. Beckman, K. B.; Ames, B. N., The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological Reviews* **1998**, 78, (2), 547-581.
159. Lee, J.; Koo, N.; Min, D. B., Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2004**, 3, (1), 21-33.
160. Meydani, M., Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2000**, 71, (6), 1665S-1668S.
161. Niedernhofer, L. J.; Daniels, J. S.; Rouzer, C. A.; Greene, R. E.; Marnett, L. J., Malondialdehyde, a Product of Lipid Peroxidation, Is Mutagenic in Human Cells. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, (33), 31426-31433.
162. Wang, T.-G.; Gotoh, Y.; Jennings, M. H.; Rhoads, C. A.; Aw, T. Y., Lipid hydroperoxide-induced apoptosis in human colonic CaCo-2 cells is associated with an early loss of cellular redox balance. *The FASEB Journal* **2000**, 14, (11), 1567-1576.
163. Salim, A. S., The permissive role of oxygen-derived free radicals in the development of colonic cancer in the rat. A new theory for carcinogenesis. *International Journal of Cancer* **1993**, 53, (6), 1031-1035.
164. Kim, R.; Emi, M.; Tanabe, K.; Murakami, S.; Uchida, Y.; Arihiro, K., Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *The Journal of Pathology* **2006**, 208, (3), 319-326.
165. Penumetcha, M.; Khan, N.; Parthasarathy, S., Dietary oxidized fatty acids: an atherogenic risk? *Journal of Lipid Research* **2000**, 41, (9), 1473-1480.
166. Staprans, I.; Rapp, J. H.; Pan, X. M.; Feingold, K. R., The effect of oxidized lipids in the diet on serum lipoprotein peroxides in control and diabetic rats. *The Journal of Clinical Investigation* **1993**, 92, (2), 638-643.
167. Esterbauer, H., Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *The American Journal of Clinical Nutrition* **1993**, 57, (5), 779S-785S.
168. Kanner, J.; Lapidot, T., The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, 31, (11), 1388-1395.
169. Stryer, L., Oxygen-transporting proteins: myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry* **1988**, 143-176.
170. Lampe, J. W., Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* **1999**, 70, (3), 475S-490S.
171. Robards, K.; Prenzler, P. D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W., Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry* **1999**, 66, (4), 401-436.
172. Moure, A. s.; Cruz, J. M.; Franco, D.; Dominguez, J. M.; Sineiro, J.; Dominguez, H.; Jose Alvarez, M. I. a.; Parajó, J. C., Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry* **2001**, 72, (2), 145-171.

173. Wilson, B. R.; Pearson, A. M.; Shorland, F. B., Effect of total lipids and phospholipids on warmed-over flavor in red and white muscle from several species as measured by thiobarbituric acid analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1976**, 24, 7-11.
174. Løvaas, E., *Marine phospholipids (MPL): resources, applications and markets. In: Seafood research from fish to dish: quality, safety and processing of wild and farmed fish.* Wageningen Academic: Netherlands 2006.
175. Lee, C. M.; Toledo, R. T., Degradation of fish muscle during mechanical deboning and storage with emphasis on lipid oxidation. *Journal of Food Science* **1977**, 42, (6), 1646-1649.
176. Spencer, K. E. B., E. G.; Chandra, C. V.; Lemon, D. W., Canadian testing of fatty species for surimi. In *Fatty Fish Utilization: Upgrading from Feed to Food*, Davis, N., Ed. Proceedings of a National Technical Conference in Raleigh: (Raleigh, NC, 1987; pp 121-136.
177. Torres, J. L. s.; Varela, B. a.; García, M. a. T.; Carilla, J.; Matito, C.; Centelles, J. J.; Cascante, M.; Sort, X.; Bobet, R. l., Valorization of Grape (*Vitis vinifera*) Byproducts. Antioxidant and Biological Properties of Polyphenolic Fractions Differing in Procyanidin Composition and Flavonol Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50, (26), 7548-7555.
178. Pazos, M.; Gallardo, J. M.; Torres, J. L.; Medina, I., Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry* **2005**, 92, 547-557.
179. Benzie, I. F. F.; Strain, J. J., The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* **1996**, 239, (1), 70-76.
180. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* **1995**, 28, (1), 25-30.
181. Sevgi, K.; Ocak, M.; Ku  k, M.; Abbasoglu, R., Does caffeine bind to metal ions? *Food Chemistry* **2004**, 84, (3), 383-388.
182. Lea, C. H., Methods for determining peroxide in lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1952**, 3, (12), 586-594.
183. Stine, C. M.; Harland, H. A.; Coulter, S. T.; Jenness, R., A Modified Peroxide Test for Detection of Lipid Oxidation in Dairy Products. *Journal of Dairy Science* **1954**, 37, (2), 202-208.
184. Frankel, E. N.; Huang, S.-W.; Kanner, J.; German, J. B., Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1994**, 42, (5), 1054-1059.
185. McDonald, R. E.; Hultin, H. O., Some Characteristics of the Enzymic Lipid Peroxidation System in the Microsomal Fraction of Flounder Skeletal Muscle. *Journal of Food Science* **1987**, 52, (1), 15-21.
186. Jones, M. N., The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterisation. *Advances in Colloid and Interface Science* **1995**, 54, 93-128.
187. Santos, N. C.; Prieto, M.; Castanho, M. A. R. B., Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2003**, 1612, (2), 123-135.
188. Fernandes, M. X.; García de la Torre, J.; Castanho, M. A. R. B., Joint determination by Brownian dynamics and fluorescence quenching of the in-depth location profile of biomolecules in membranes. *Analytical Biochemistry* **2002**, 307, (1), 1-12.

189. Florine-Casteel, K., Phospholipid order in gel- and fluid-phase cell-size liposomes measured by digitized video fluorescence polarization microscopy. *Biophysical journal* **1990**, 57, (6), 1199-1215.
190. Kaiser, R. D.; London, E., Location of Diphenylhexatriene (DPH) and Its Derivatives within Membranes: Comparison of Different Fluorescence Quenching Analyses of Membrane Depth. *Biochemistry* **1998**, 37, (22), 8180-8190.
191. Parasassi, T.; De Stasio, G.; d'Ubaldo, A.; Gratton, E., Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal* **1990**, 57, (6), 1179-1186.
192. London, E.; Brown, D. A., Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2000**, 1508, (1-2), 182-195.
193. Edward A, D., Formation and characterization of mixed micelles of the nonionic surfactant Triton X-100 with egg, dipalmitoyl, and dimyristoyl phosphatidylcholines. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1974**, 165, (2), 764-773.
194. Robson, R. J.; Dennis, E. A., Mixed micelles of sphingomyelin and phosphatidylcholine with nonionic surfactants: Effect of temperature and surfactant polydispersity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1979**, 573, (3), 489-500.
195. Jurgen, L., Interaction of detergents with lipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1995**, 1241, (2), 269-292.
196. Chapman, D.; Collin, D. T., Differential Thermal Analysis of Phospholipids. *Nature* **1965**, 206, (4980), 189-189.
197. Meunier, V.; Bourrié, M.; Berger, Y.; Fabre, G., The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biology and Toxicology* **1995**, 11, (3), 187-194.
198. Pinto, M.; Robine-Leon, S.; Appay, M., Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* **1983**, 47, 323-330.
199. Hidalgo, I. J.; Raub, T. J.; Borchardt, R. T., Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **1989**, 96, (3), 736-749.
200. Levin, M. S.; Talkad, V. D.; Gordon, J. I.; Stenson, W. F., Trafficking of exogenous fatty acids within Caco-2 cells. *Journal of Lipid Research* **1992**, 33, (1), 9-19.
201. Trotter, P. J.; Storch, J., Fatty acid uptake and metabolism in a human intestinal cell line (Caco-2): comparison of apical and basolateral incubation. *Journal of Lipid Research* **1991**, 32, (2), 293-304.
202. Zweibaum, A.; Laburthe, M.; Grasset, E.; Louvard, D., Use of Cultured Cell Lines in Studies of Intestinal Cell Differentiation and Function. In *Comprehensive Physiology*, John Wiley & Sons, Inc.
203. Pazos, M.; Medina, I.; Hultin, H. O., Effect of pH on Hemoglobin-Catalized lipid oxidation in Cod Muscle Membranes in Vitro and in Situ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, 3605-3612.
204. Richards, M. P.; Dettman, M. A., Comparative analysis of different hemoglobins: Autoxidation, Reaction with peroxide, and lipid oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51, 3886-3891.
205. Grunwald, E. W.; Richards, M. P., Studies with myoglobin variants indicate that released heme is the primary promoter of lipid oxidation in washed fish muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54, (12), 4452-4460.

206. Richards, M. P. Contributions of blood and blood components to lipid oxidation in fish muscle. PhD. Dissertation, University of Massachusetts-Amherst, 2000.
207. Richards, M. P.; Kelleher S. D.; Hultin, H. O., Effect of washing with or without antioxidants on quality retention of mackerel fillets during refrigerated and frozen storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, 46, 4363-4371.
208. Sanchez-Alonso, I.; Borderias, J.; Larsson, K.; Undeland, I., Inhibition of Hemoglobin-Mediated Oxidation of Regular and Lipid-Fortified Washed Cod Mince by a White Grape Dietary Fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, 55, (13), 5299-5305.
209. Lee, C.-H.; Krueger, C. G.; Reed, J. D.; Richards, M. P., Inhibition of hemoglobin-mediated lipid oxidation in washed fish muscle by cranberry components. *Food Chemistry* **2006**, 99, (3), 591-599.
210. Hu, M.; Skibsted, L. H., Kinetics of Reduction of Ferrylmyoglobin by (α)-Epigallocatechin Gallate and Green Tea Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50, (10), 2998-3003.
211. Larsson, K.; Almgren, A.; Undeland, I., Hemoglobin-Mediated Lipid Oxidation and Compositional Characteristics of Washed Fish Mince Model Systems Made from Cod (*Gadus morhua*), Herring (*Clupea harengus*), and Salmon (*Salmo salar*) Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, 55, (22), 9027-9035.
212. Bañón, S.; Díaz, P.; Rodríguez, M.; Garrido, M. D.; Price, A., Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. *Meat Science* **2007**, 77, (4), 626-633.
213. Lau, D. W.; King, A. J., Pre- and Post-Mortem Use of Grape Seed Extract in Dark Poultry Meat To Inhibit Development of Thiobarbituric Acid Reactive Substances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51, (6), 1602-1607.
214. Medina, I.; Gallardo, J. M.; Gonzalez, M. J.; Lois, S.; Hedges, N., Effect of molecular structure of phenolic families as hydroxycinnamic acids and catechins on their antioxidant effectiveness in minced fish muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, 55, (10), 3889-3895.
215. Pazos, M.; Alonso, A.; Fernández-Bolaños, J.; Torres, J. L.; Medina, I., Physicochemical Properties of Natural Phenolics from Grapes and Olive Oil by-products and their Antioxidant activity in Frozen Horse Mackerel Fillets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54, 366-373.
216. Brannan, R. G., Effect of grape seed extract on physicochemical properties of ground, salted, chicken thigh meat during refrigerated storage at different relative humidity levels. *Journal of Food Science* **2008**, 73, (1).
217. Alamed, J.; Chaiyasit, W.; McClements, D. J.; Decker, E. A., Relationships between Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, 57, (7), 2969-2976.
218. Hsieh, R. J.; Kinsella, J. E.; John, E. K., Oxidation of Polyunsaturated Fatty Acids: Mechanisms, Products, and Inhibition with Emphasis on Fish. In *Advances in Food and Nutrition Research*, Academic Press: 1989; Vol. Volume 33, pp 233-341.
219. Tres, A.; Bou, R.; Codony, R.; Guardiola, F., Influence of Different Dietary Doses of n-3- or n-6-Rich Vegetable Fats and Tocopheryl Acetate Supplementation on Raw and Cooked Rabbit Meat Composition and Oxidative Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, (16), 7243-7253.
220. Min, B.; Nam, K. C.; Cordray, J.; Ahn, D. U., Endogenous Factors Affecting Oxidative Stability of Beef Loin, Pork Loin, and Chicken Breast and Thigh Meats. *Journal of Food Science* **2008**, 73, (6), C439-C446.

221. Yancey, E. J.; Grobbel, J. P.; Dikeman, M. E.; Smith, J. S.; Hachmeister, K. A.; Chambers Iv, E. C.; Gadgil, P.; Milliken, G. A.; Dressler, E. A., Effects of total iron, myoglobin, hemoglobin, and lipid oxidation of uncooked muscles on livery flavor development and volatiles of cooked beef steaks. *Meat Science* **2006**, 73, (4), 680-686.
222. Pazos, M.; Sánchez, L.; Medina, I., α -Tocopherol oxidation in fish muscle during chilling and frozen storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, 4000-4005.
223. Packer, J. E.; Slater, T. F.; Willson, R. L., Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* **1979**, 278, (5706), 737-738.
224. Nuin, M.; Alfaro, B. a.; Cruz, Z.; Argarate, N.; George, S.; Le Marc, Y.; Olley, J.; Pin, C., Modelling spoilage of fresh turbot and evaluation of a time temperature integrator (TTI) label under fluctuating temperature. *International Journal of Food Microbiology* **2008**, 127, (3), 193-199.
225. Haugen, J.-E.; Lundby, F.; Wold, J. P.; Veberg, A., Detection of rancidity in freeze stored turkey meat using a commercial gas-sensor array system. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2006**, 116, (1-2), 78-84.
226. Haugen, J.-E.; Undeland, I., Lipid Oxidation in Herring Fillets (*Clupea harengus*) during Ice Storage Measured by a Commercial Hybrid Gas-Sensor Array System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 51, (3), 752-759.
227. Tso, P., Gastrointestinal digestion and absorption of lipid. *Adv Lipid Res* **1985**, 21, 143-186.
228. Mattson, F. H.; Volpenhein, R. A., The Digestion and Absorption of Triglycerides. *Journal of Biological Chemistry* **1964**, 239, (9), 2772-2777.
229. Thomson, A.; Schoeller, C.; Keelan, M.; Smith, L.; Clandinin, M., Lipid absorption: passing through the unstirred layers, brush-border membrane, and beyond. *Can J Physiol Pharmacol* **1993**, 71, (8), 531-55.
230. Adam, S.; Soelaiman, I.; Umar, N.; Jaarin, K., Effects of Repeatedly Heated Palm Oil on Serum Lipid Profile, Lipid Peroxidation and Homocysteine Levels in a Post-Menopausal Rat Model. *McGill J Med* **2008**, 11, (2), 145-151.
231. Meigs, J. B.; Larson, M. G.; Fox, C. S.; Keaney, J. F.; Vasan, R. S.; Benjamin, E. J., Association of Oxidative Stress, Insulin Resistance, and Diabetes Risk Phenotypes. *Diabetes Care* **2007**, 30, (10), 2529-2535.
232. Amirkhizi, F.; Siassi, F.; Minaie, S.; Djalali, M.; Rahimi, A.; Chamari, M., Is obesity associated with increased plasma lipid peroxidation and oxidative stress in women? . *Arya Atherosclerosis* **2007**.
233. Harrison, D. G.; Gongora, M. C., Oxidative Stress and Hypertension. *The Medical clinics of North America* **2009**, 93, (3), 621-635.
234. Wijeratne, S. S. K.; Cuppett, S. L.; Schlegel, V., Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Stress Damage and Antioxidant Enzyme Response in Caco-2 Human Colon Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, (22), 8768-8774.
235. Wijeratne, S. S. K.; Cuppett, S. L., Lipid Hydroperoxide Induced Oxidative Stress Damage and Antioxidant Enzyme Response in Caco-2 Human Colon Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54, (12), 4476-4481.
236. Gorelik, S.; Ligumsky, M.; Kohen, R.; Kanner, J., The Stomach as a Bioreactor : When Red Meat Meets Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, (13), 5002-5007.
237. Lapidot, T.; Granit, R.; Kanner, J., Lipid Hydroperoxidase Activity of Myoglobin and Phenolic Antioxidants in Simulated Gastric Fluid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, (9), 3391-3396.

238. Gorelik, S.; Kohen, R.; Ligumsky, M.; Kanner, J., Saliva plays a dual role in oxidation process in stomach medium. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2007**, 458, (2), 236-243.
239. Lorrain, B. n. d.; Dangles, O.; Genot, C.; Dufour, C., Chemical Modeling of Heme-Induced Lipid Oxidation in Gastric Conditions and Inhibition by Dietary Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, 58, (1), 676-683.
240. Wijeratne, S. S. K.; Cuppett, S. L., Soy Isoflavones Protect the Intestine from Lipid Hydroperoxide Mediated Oxidative Damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, 55, (24), 9811-9816.
241. Loest, H. B.; Noh, S. K.; Koo, S. I., Green Tea Extract Inhibits the Lymphatic Absorption of Cholesterol and alpha-Tocopherol in Ovariectomized Rats. *The Journal of Nutrition* **2002**, 132, (6), 1282-1288.
242. Ikeda, I.; Yamahira, T.; Kato, M.; Ishikawa, A., Black-Tea Polyphenols Decrease Micellar Solubility of Cholesterol in Vitro and Intestinal Absorption of Cholesterol in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, (15), 8591-8595.
243. Casaschi, A.; Wang, Q.; Dang, K. o.; Richards, A.; Theriault, A., Intestinal apolipoprotein B secretion is inhibited by the flavonoid quercetin: Potential role of microsomal triglyceride transfer protein and diacylglycerol acyltransferase. *Lipids* **2002**, 37, (7), 647-652.
244. Murota, K.; Storch, J., Uptake of Micellar Long-Chain Fatty Acid and sn-2-Monoacylglycerol into Human Intestinal Caco-2 Cells Exhibits Characteristics of Protein-Mediated Transport. *The Journal of Nutrition* **2005**, 135, (7), 1626-1630.
245. Trotter, P. J.; Ho, S. Y.; Storch, J., Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. *Journal of Lipid Research* **1996**, 37, (2), 336-46.
246. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J., Protein measurement with the folin phenol reagent *Journal of Biological Chemistry* **1951**, 193, (1), 265-275.
247. Bligh, E. G.; Dyer, W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *J. Biochem Physiol.* **1959**, 37, 911-917.
248. Trotter, P. J.; Storch, J., Fatty acid esterification during differentiation of the human intestinal cell line Caco-2. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268, (14), 10017-10023.
249. Herbes, S. E.; Allen, C. P., Lipid quantification of freshwater invertebrates: method modification for microquantitation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **1983**, 40, (8), 1315-1317.
250. Firestone, D. In *Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society.*, Champaign, IL, 1989; AOCS, Ed. IL, 1989.
251. Eklund-Jonsson, C.; Sandberg, A.-S.; Hulthén, L.; Alminger, M. L., Tempe Fermentation of Whole Grain Barley Increased Human Iron Absorption and In vitro Iron Availability. *The Open Nutrition Journal* **2008**, 2, 42-47.
252. Haraldsson, A.-K.; Rimsten, L.; Alminger, M.; Andersson, R.; Å...man, P.; Sandberg, A.-S., Digestion of barley malt porridges in a gastrointestinal model: Iron dialysability, iron uptake by Caco-2 cells and degradation of Î²-glucan. *Journal of Cereal Science* **2005**, 42, (2), 243-254.
253. Maestre, R.; Pazos, M.; Iglesias, J.; Medina, I., Capacity of Reductants and Chelators To Prevent Lipid Oxidation Catalyzed by Fish Hemoglobin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, 57, (19), 9190-9196.
254. Maestre, R.; Micol, V.; Funes, L.; Medina, I., Incorporation and Interaction of Grape Seed Extract in Membranes and Relation with Efficacy in Muscle Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58, (14), 8365-8374.

255. Gorelik, S.; Ligumsky, M.; Kohen, R.; Kanner, J., The Stomach as a Bioreactor: When Red Meat Meets Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, (13), 5002-5007.
256. Kanazawa, K.; Ashida, H., Dietary hydroperoxides of linoleic acid decompose to aldehydes in stomach before being absorbed into the body. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1998**, 1393, (2-3), 349-361.
257. Gorelik, S.; Lapidot, T.; Shaham, I.; Granit, R.; Ligumsky, M.; Kohen, R.; Kanner, J., Lipid Peroxidation and Coupled Vitamin Oxidation in Simulated and Human Gastric Fluid Inhibited by Dietary Polyphenols: Health Implications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, (9), 3397-3402.
258. Aw, T. Y., Cellular Redox: A Modulator of Intestinal Epithelial Cell Proliferation. *Physiology* **2003**, 18, (5), 201-204.
259. Aw, T. Y., Determinants of intestinal detoxication of lipid hydroperoxides. *Free Radical Research* **1998**, 28, (6), 637-646.
260. Chamulitrat, W.; Jordan, S. J.; Mason, R. P., Fatty acid radical formation in rats administered oxidized fatty acids: In vivo spin trapping investigation. *Arch Biochem Biophys* **1992**, 299, (2), 361-367.
261. Lindley, K. J.; Goss-Sampson, M. A.; Muller, D. P.; Milla, P. J., Lipid peroxidation and electrogenic ion transport in the jejunum of the vitamin E deficient rat. *Gut* **1994**, 35, (1), 34-9.
262. Ho, S.-Y.; Storch, J., Common mechanisms of monoacylglycerol and fatty acid uptake by human intestinal Caco-2 cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **2001**, 281, (4), C1106-C1117.
263. Borradaile, N. M.; de Dreu, L. E.; Barrett, P. H. R.; Behrsin, C. D.; Huff, M. W., Hepatocyte ApoB-Containing Lipoprotein Secretion Is Decreased by the Grapefruit Flavonoid, Naringenin, via Inhibition of MTP-Mediated Microsomal Triglyceride Accumulation *Biochemistry* **2003**, 42, (5), 1283-1291.
264. Shikama, K., The molecular mechanism of autoxidation for myoglobin and hemoglobin: A venerable puzzle. *Chemical Reviews* **1998**, 98, 1357-1373.
265. Reeder, B. J.; Wilson, M. T., Mechanism of reaction of myoglobin with the lipid hydroperoxide hydroperoxyoctadecadienoic acid. *Biochemical Journal* **1998**, 330, 1317-1323.
266. Nath, K. A.; Haggard, J. J.; Croatt, A. J.; Grande, J. P.; Poss, K. D.; Alam, J., The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *American Journal of Pathology* **2000**, 156, (5), 1527-1535.
267. Wilson, B. R.; Pearson, A. M.; Shorland, F. B., Effect of total lipids and phospholipids on warmed-over flavor in red and white muscle from several species as measured by thiobarbituric acid analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1976**, 24, (1), 7-11.
268. Wu, T. C.; Sheldon, B. W., Influence of Phospholipids on the Development of Oxidized Off Flavors in Cooked Turkey Rolls. *Journal of Food Science* **1988**, 53, (1), 55-61.
269. Kurade, S. A.; Baranowski, J. D., Prediction of Shelf-Life of Frozen Minced Fish in Terms of Oxidative Rancidity as Measured by TBARS Number. *Journal of Food Science* **1987**, 52, (2), 300-302.

